

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

**DISSERTAÇÃO**

**Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas dos**  
**Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em**  
**Genótipos de Milho**

**Gabriela Cavalcanti Alves**

**2007**



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

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
DOS GÊNEROS *HERBASPIRILLUM* E *BURKHOLDERIA* EM  
GENÓTIPOS DE MILHO**

**GABRIELA CAVALCANTI ALVES**

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

*e Co-orientação do Professora*  
**Vera Lúcia Divan Baldani**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2007

633.15894

A474e

T

Alves, Gabriela Cavalcanti, 1975-  
Efeito da inoculação de bactérias  
diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e  
*Burkholderia* em genótipos de milho /  
Gabriela Cavalcanti Alves. - 2007.  
53 f. : il.

Orientadora: Verônica Massena Reis.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 33-43.

1. Milho - Adubos e fertilizantes -  
Teses. 2. Fertilizante nitrogenado -  
Teses. 3. Milho - Microbiologia -  
Pesquisa - Teses. I. Reis, Verônica  
Massena, 1961- II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto de  
Agronomia. III. Título.

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

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

**GABRIELA CAVALCANTI ALVES**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/02/2007

---

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

---

Fábio Bueno dos Reis. Jr. Dr. Embrapa Cerrados

---

Ivanildo Evódio Marriel. Dr. Embrapa Milho e Sorgo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico à minha mãe, Myrian,  
meus irmãos, Carolina e Eduardo,  
ao meu marido, Lusimar e  
aos meus filhos, Victor e Pedro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudo para realização dos meus estudos de mestrado.

Ao CPGA-CS, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela oportunidade da formação concedida.

À Embrapa-Agrobiologia, pelo apoio estrutural, financeiro e de pessoal para realização de todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Veronica Massena Reis, pelo acompanhamento e orientação na execução deste trabalho e por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

À Dra. Vera Lúcia Divan Baldani pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e principalmente pelo enorme carinho.

Aos amigos-parceiros Liamara Perin e Carlos Leandro, que tanto contribuíram para execução desta dissertação.

Aos bolsistas e amigos: Daniele, Joilson, Salomão, Michelle, Erineudo, Marinete, Edilson, Sandy, Helma, Luc, Ricardo, Patrícia, Cristiane, Samuel, Willian, Wilmondes, Guilherme e Cecília pelas sugestões, auxílios, amizade, incentivo, companhia e cumplicidade.

Aos funcionários do campo experimental da Embrapa Agrobiologia: Ernani, Claudinho, Naldo, Paulo, Babo, Enivaldo, Arlei, Roberto, Manoel, Edinelson, Roberto Carlos, Silvio, Samuel, Ozéias, Silão, Edilson, Waldir, Ébio, Ivana, Serginho, Elias, Josias, José Pedro e Joãozinho pela presteza e esforço em todos os experimentos que conduzimos juntos.

Ao Geraldo pelo apoio incondicional e pela amizade.

Aos pesquisadores Dr. José Ivo Baldani, Dr. Sebastião Manhães, Rosa Pitard, Dra. Janaína Ribeiro, Dr. Marcelo Grandi, Dr. Segundo Urquiaga, Dr. Paulo Dias, Dr. Bruno Alves, Dr. Robert Boddey e ao Dr. Jean Luiz pelas orientações e estímulo para o prosseguimento do trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia: Luiz Carlos, Marildo, Jorge, Mazinho, Carlinhos, Mazinho (Manutenção), Fernando, Jaime, Hugo, Roberto Grégio, Dorimar, Jorge, Valéria, Altiberto, Roberto Andrade, Cíntia, Itamar, Luízinho, Monalisa, Flávio, Palmira, João, Lívia, Daise, Maria Helena, Adilson, Diniz, Jonathas, Delso, Wallace, Robson, Jhony, Neném, Nélio em especial ao Wilson e ao Lúcio, pois todos sempre me ajudaram em tudo que precisei e pelas constantes palavras de incentivo.

À Professora Lúcia dos Anjos e Professor Marcos Gervásio pela amizade e pela confiança.

Aos funcionários da pós-graduação: Luciene, Marquinhos e Roberto pelos inúmeros esclarecimentos e auxílios.

Às estagiárias da Biblioteca da Embrapa Agrobiologia: Daiane e Taís pela ajuda em todo o tempo que estive por lá.

Ao S. Sílvia e sua maravilhosa família pela amizade, pelo carinho e pelo amor que dedicaram ao meu filho mais novo, o que permitiu a realização desta tarefa com tranquilidade.

À minha sogra, Ivanete, meu sogro, Gonzaga e minha cunhada Lusicleide pela torcida mesmo de tão longe.

Às minhas avós, Djanyra e Genny, à minha madrinha Rita, aos meus tios, Zezinho e Márcio, à tia Vera e aos meus primos, Matheus, Rafaela, Andréa, Zito, Gustavo e Cristiane pela compreensão da ausência e o carinho constante.

Ao meu irmão Eduardo pelo companheirismo e incentivo.

À minha irmã Carolina pelo amor recíproco e por sempre estar do meu lado.

Ao meu pai (*in memoriam*) por ser a referência da minha vida.

À minha mãe, a pessoa mais importante, que me deu a vida e me ensinou a andar, para seguir este caminho. Obrigada pelas orações!

Ao meu companheiro de todas as horas, Lusimar, pelo incentivo, apoio e principalmente pelas críticas que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos Victor e Pedro que são meu maior bem, que tornaram esta etapa mais prazerosa, com alegria e carinho sempre presentes.

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

Muito obrigada!!!

## **BIOGRAFIA**

A autora nasceu aos 10 dias de agosto de 1975, no município do Rio de Janeiro, RJ. Filha de Luiz Eduardo Gouvêa Alves e Myrian Cavalcanti Silva Gouvêa Alves, concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Infante Dom Henrique em 1992. Ingressou no curso superior em Agronomia da UFRRJ em 1993 e fez estágio no Departamento de Solos da mesma universidade, no laboratório de Pedologia de 1997 a 1998, e no laboratório de Fauna de Solo de 1998 a 1999, na Embrapa-Agrobiologia. Após concluir a graduação em 2000, participou do projeto do Pronex, na Embrapa Agrobiologia, entre 2002 e 2005. Em 2005 iniciou o Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo pela UFRRJ e concluiu no dia de hoje.

## RESUMO

ALVES, Gabriela Cavalcanti. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

A seleção de bactérias diazotróficas para aplicação na cultura do milho tem sido alvo da pesquisa nos últimos 30 anos. Inicialmente eram utilizadas estirpes pertencentes ao gênero *Azospirillum*, sendo que a maior parte da literatura publicada refere-se ao uso de estirpes de *A. brasilense*. Atualmente, a pesquisa revelou que uma comunidade bastante diversa de bactérias diazotróficas coloniza não só raízes, mas também colmos e folhas de milho e novos gêneros e espécies foram descritos. Este trabalho teve por objetivo testar o efeito de promoção de crescimento de estirpes pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de diferentes localidades e depositadas na coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia em genótipos de milho. Foram testadas 49 estirpes sendo 24 do gênero *Herbaspirillum* e 25 do gênero *Burkholderia*. A seleção constou de uma fase onde sementes do milho híbrido SHS 5050 e milho variedade BRS Sol da Manhã foram plantadas em substrato esterilizado. Os tratamentos inoculados receberam 1 mL por semente de uma suspensão celular contendo  $10^8 - 10^9$  células e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de N, sendo que os controles foram uma testemunha absoluta e duas testemunhas não inoculadas, mas adubadas com 10 e  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  de N, respectivamente. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Aos 40 dias, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto a matéria seca da parte aérea e sistema radicular, área e comprimento radicular e teor de nitrogênio. Todas as variáveis foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Na segunda fase, este mesmo ensaio foi conduzido em substrato não esterilizado. Nesta fase foram testadas as 21 melhores estirpes. Na terceira fase, a melhor estirpe BR 11417 (ZAE94) foi avaliada em experimentos tanto na época da safra como na safrinha de 2005/2006. Os ensaios de campo foram conduzidos em fatorial de blocos ao acaso com seis repetições. No experimento de safra foram testados quatro genótipos: BRS Sol da Manhã (variedade), BRS 106 (variedade), BRS 1030 (Híbrido simples) e SHS 5050 (Híbrido triplo) na Embrapa Agrobiologia. No experimento de safrinha não foi utilizado o BRS Sol da Manhã dentre os citados. O inoculante contendo a estirpe selecionada foi aplicado na ausência de N e na presença de doses crescentes de N fertilizante ( $40$  e  $80 \text{ kg ha}^{-1}$ ), além dos mesmos tratamentos sem inoculação. Avaliou-se a produtividade de grãos, o número de plantas e espigas por planta e o teor de N dos grãos. Todas as variáveis na última fase (campo) foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott quando utilizados os fatores inoculação e genótipo e pelo teste de regressão quando utilizado o fator adubação. Além disso, foi feita a quantificação da FBN pela técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$ . Os resultados obtidos mostraram que a aplicação do inoculante incrementou a produtividade de milho em até 34 %, não significativamente, dependendo do genótipo de milho e da dose de N-mineral. Os resultados da quantificação da FBN permitiram concluir que o híbrido SHS 5050, inoculado com a estirpe selecionada, apresentou maior capacidade de obter contribuições para sua nutrição nitrogenada através da FBN que as variedades, inoculadas com a mesma estirpe nos dois experimentos realizados em épocas diferentes.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., Fixação Biológica de Nitrogênio,  $^{15}\text{N}$ .

## ABSTRACT

ALVES, Gabriela Cavalcanti. **Effect of inoculation of diazotrophic bacteria of the genera *Herbaspirillum* and *Burkholderia* in genotypes of maize.** 2007. 53p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The selection of diazotrophic bacteria for application in maize has been the goal of the research in the last the 30 years. First, strains from the *Azospirillum* genus were used, being the most published literature about the use of *A. brasilense*. At this moment, the researches disclosed that an amply diverse community of diazotrophic bacteria not only colonizes roots, but also stems and leaves of maize, and new genus and species had been described. The objective of this study was to test the effect of growth promotion of *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains, isolated from different places and deposited in the Embrapa diazotrophic bacteria collection at Embrapa Agrobiologia. This selection used 49 strains, being 24 of *Herbaspirillum* genus and 25 of *Burkholderia* genus. The selection consisted of a phase where seeds of the hybrid maize SHS 5050 and maize variety BRS “Sol da Manhã” had been planted in sterile substratum. The inoculated treatments had received 1 mL per seed from a cellular suspension contend  $10^8$  -  $10^9$  cells and 150 mg of N, being the controls an absolute witness and two witnesses not inoculated, but fertilized with 150 and 300 mg of N, respectively. The used delineation was entirely at random with 4 repetitions. After 40 days the plants had been collected and evaluated dry matter accumulation of the aerial part and root system, root area and length and % nitrogen. All the variables had been evaluated by the Scott-Knott test at 5 % of probability. In the second phase, the same test was done in non-sterile soil. At this moment the best 21 strains were tested. In the third phase, the best strain BR 11417 (ZAE94 – *Herbaspirillum seropedicae*) was evaluated in experiments with maize planted in two periods, normal cycle or “safra”, and a short cycle or “safrinha” in 2005/2006. The field experiments were conducted using random blocks with six repetitions. In the “safra” experiment four genotypes were tested: Sol da Manhã (variety), BRS 106 (variety), BRS 1030 (Hybrid simple), and SHS 5050 (Hybrid triple) in the Embrapa Agrobiologia. At the “safrinha”, the variety Sol da Manhã was not used. The inoculant containing the selected strain was applied in the absence of N and in the presence of increasing doses of fertilizing N (40 and 80 kg ha<sup>-1</sup>), besides the same treatments without inoculation. The grain productivity, the number of spikes per plant, and the N level in the grains were evaluated. All the variables in the last phase of selection (field) were evaluated by Scott-Knott test, when the factors inoculation and genotype were tested, and regression test when used the factor fertilization. In addition, the technique of the natural abundance of <sup>15</sup>N was used to quantify the BNF. The results had shown that the application of the inoculant resulted in increment of maize productivity up to 34 %, though it showed to be non-significantly, depending on the maize genotype and the N-mineral dosage. The BNF quantification results had lead to the conclusion that the hybrid SHS 5050, inoculated with the selected strain, presented higher capacity of obtaining contribution to its nitrogen supply from the BFN than the other varieties, inoculated with the same strain in both experiments at different time.

**Key words:** *Zea mays* L. Biological Nitrogen Fixation. <sup>15</sup>N.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1	A Cultura do Milho .....	2
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico .....	3
2.3	Bactérias Diazotróficas .....	4
2.3.1	Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	5
2.3.2	Gênero <i>Burkholderia</i> .....	6
2.4	Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Milho .....	6
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1	Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado .....	8
3.1.1	Organismos e preparo do inóculo .....	8
3.1.2	Condições experimentais .....	9
3.1.3	Delineamento experimental .....	10
3.2	Seleção de Estirpes em Substrato Não Esterilizado .....	10
3.2.1	Organismos e preparo do inóculo .....	10
3.2.2	Condições experimentais .....	10
3.2.3	Delineamento experimental .....	11
3.3	Avaliação da Eficiência da Estirpe Seleccionada em Condições de Campo .....	11
3.3.1	Localização da área de estudo .....	11
3.3.2	Inóculo e inoculação .....	12
3.3.4	Condições e delineamentos experimentais .....	12
3.4	Quantificação da FBN .....	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
4.1	Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado .....	15
4.2	Seleção de Estirpes em Substrato Não Esterilizado .....	21
4.3	Teste de Estirpes em Condições de Campo .....	24
4.3.1	Produtividade de grãos na safrinha .....	24
4.3.2	Produtividade de grãos na safra .....	25
4.4	Quantificação da FBN .....	27
5	CONCLUSÕES .....	30
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
7	ANEXOS .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos elementos requeridos em maior quantidade pelas plantas. O único processo biológico de obtenção de N, disponível na natureza, e que pode beneficiar as plantas, é a Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico (FBN). O processo de FBN é realizado por um grupo restrito de organismos ditos diazotróficos. Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, aqueles que vivem associados com outros organismos e aqueles que vivem em simbiose. O maior exemplo de sucesso de sua aplicação biotecnológica no Brasil é a inoculação da soja, exemplo de simbiose destes organismos com plantas.

A produção de grãos pode ser barateada com o aumento da dependência das plantas pela FBN, inclusive para fins de produção de biocombustíveis onde há dependência de sistemas que possuam um balanço energético positivo, ou seja, menor energia gasta para produzir o combustível do que a gerada pelo mesmo. Na Europa e EUA, a elevada mecanização da agricultura e o uso de níveis elevados de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, resultam em um gasto maior de energia do que a produzida pelos diversos biocombustíveis disponíveis.

No Brasil, devido a falta de subsídios para fertilizantes, os adubos minerais nitrogenados comerciais são usados normalmente em doses menores que um quinto das aplicadas nos países industrializados. Isso acarretou, ao longo de décadas, em diversas culturas, a seleção natural ou melhoramento de genótipos com capacidade de se associarem com bactérias fixadoras de  $N_2$ , obtendo-se assim grande parte do N necessário através da FBN. Por esta razão, o Brasil assumiu a liderança nas pesquisas sobre produção de grãos com níveis muito baixos de adubação nitrogenada, sem diminuição da produtividade.

Diante do cenário atual, o potencial de uso de bactérias diazotróficas como alternativa para a nutrição nitrogenada em diversas culturas de poáceas (antiga família das gramíneas) de importância econômica pode ter forte impacto em culturas como milho, não apenas no que se refere ao volume de produção e tamanho de área plantada, mas também por sua importância sócio-econômica. O milho, além de ser utilizado diretamente na alimentação humana e de animais domésticos, constitui matéria-prima básica para uma série de produtos industrializados, criando e movimentando grandes complexos industriais onde empregos são gerados e favorecendo a fixação do homem no campo.

Este estudo utiliza bactérias diazotróficas, visando garantir a diminuição do uso de insumos, sem diminuir os índices de produtividade econômica. Como são microrganismos benéficos para as plantas, não se espera nenhum tipo de interação negativa pela adoção do produto, que pode inclusive contribuir com estímulo de outras características vegetais, atuando como microrganismos promotores de crescimento pelo aumento da área de superfície radicular e foliar, acúmulo de massa seca e até mesmo na resistência e controle de pragas.

Espera-se que a aplicação desta forma alternativa de adubo reduza a necessidade de aplicação de N fertilizante para a cultura do milho. Todos esses ganhos são fundamentais, principalmente em propriedades de baixo uso tecnológico, que é o caso de agricultores familiares onde o uso de insumos é muito baixo ou nulo. Neste patamar mínimo de produtividade é esperado o maior ganho com o uso de bactérias diazotróficas.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que as bactérias diazotróficas podem suprir total ou parcialmente as necessidades de N para a cultura do milho.

O objetivo foi testar o efeito da promoção de crescimento de estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, selecionando estirpes, avaliando em condições de campo e quantificando o N fixado.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais antigas do mundo, havendo indicações, através de escavações arqueológicas e geológicas, e de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 6000 anos (PIPERNO & FLANNERY, 2001). Logo depois do descobrimento da América Central e do Norte, o milho foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Passou então a ser plantado em escala comercial e difundiu-se por todos os continentes (FAGERIA, 1989; NORMAN et al., 1995; TOLLENAAR & DWYER, 1999).

Há indícios de que a origem do milho tenha sido no México (MACNEISH & EUBANKS, 2000; DOEBLEY, 1990) e seus parentes mais próximos são os teosintes. Apesar das divergências morfológicas entre o milho moderno e os teosintes, vários estudos indicam que algumas variedades de teosinte são citologicamente equivalentes ao milho, sendo capazes de formar híbridos férteis com este (DOEBLEY, 2004). Ao que tudo indica, o milho foi originado do teosinte através da seleção feita por civilizações indígenas (BEADLE, 1939).

O milho é caracterizado como planta monocotiledônea, da família das poáceas, cujo ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima (FAGERIA, 1989; NORMAN et al., 1995; TOLLENAAR & DWYER, 1999). Além disso, é uma planta C4, sendo extremamente eficiente na conversão de CO<sub>2</sub>, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz.

Na evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem destaque como terceiro maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos e pela China. No ano agrícola de 2005/06 a produção mundial ficou em torno de 684 milhões de toneladas, tendo sido produzido 282 milhões de toneladas pelos Estados Unidos, 134 milhões pela China e 43 milhões pelo Brasil (USDA, 2006). Apesar de estar entre os três maiores produtores, o Brasil não se destaca entre os países com maior produtividade. Considerando que a produtividade média mundial está pouco acima de quatro toneladas por hectare, nota-se que o Brasil está abaixo desta média. Porém, a produtividade brasileira tem crescido sistematicamente, passando de 1870 kg ha<sup>-1</sup> em 1990, para 3160 kg ha<sup>-1</sup> em 2005 (IBGE, 2006).

No cenário nacional, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura brasileira, sendo que no ano agrícola de 2005/06, sua produção correspondeu a 30,8 % da produção total de grãos no país, só perdendo para a soja, que representou 45,3 % da produção nacional (IBGE, 2006). Embora o milho seja uma importante cultura para o agronegócio brasileiro, praticamente toda a sua produção é consumida internamente, ao contrário da soja que concentra sua comercialização em mercados externos.

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

No início da expansão do milho safrinha, os rendimentos eram muito baixos e os investimentos em insumos desprezíveis, pois safrinha era sinônimo de risco e baixa tecnologia. Os rendimentos médios ainda são baixos, em decorrência de parte da semeadura ser efetuada em época acentuadamente tardia (DUARTE, 2004), porém o lucro é maior por

ser a colheita realizada em período de entressafra e ter menor custo de produção (TSUNECHIRO et al., 1995). Atualmente, a tendência de preços elevados é ainda maior, devido a crescente demanda por milho para a produção de etanol, e ao aumento das importações do grão pela China.

A maior parcela dos grãos produzidos é destinada ao preparo de rações para alimentação animal, principalmente de aves e suínos, e para a produção de óleo comestível. Uma crescente parcela da produção de milho tem sido destinada à fabricação de produtos para a alimentação humana direta, tais como farinhas, cereais matinais, salgadinhos e xaropes de dextrose, indicando uma maior adoção do milho como fonte de alimento pelos brasileiros. A participação do milho tem crescido e deverá crescer ainda mais no setor da produção de plásticos biodegradáveis a partir de amido de milho (DA RÓZ, 2003) e na produção de etanol.

O Brasil planta em média 12 milhões de hectares de milho anualmente, sendo aproximadamente 70 % dessa área na safra e 30 % na safrinha. A produtividade média brasileira está em torno de 3200 kg ha<sup>-1</sup> na safra normal e 2200 kg ha<sup>-1</sup> na safrinha, produtividade baixa quando comparada à alcançada pelos produtores que adotam mais tecnologia e atinge 6 a 12 mil kg ha<sup>-1</sup> na safra, razão pela qual a produção de milho ainda é menor que o consumo, sendo suplementado pela importação do exterior (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2000).

A importância do milho ainda está relacionada ao aspecto social, pois grande parte dos produtores brasileiros utiliza pouca tecnologia, não possui grandes extensões de terras, e cultiva para subsistência comercializando o excedente, fator que se reflete nas baixas produtividades médias. Portanto, pode-se afirmar que há uma clara dualidade na produção de milho no Brasil: uma grande parcela de produtores que não estão envolvidos com a produção comercial e que atingem apenas baixos índices de produtividade, e uma pequena parcela de produtores, com elevado índice de produtividade, com aplicação intensiva de tecnologia e elevado investimento de capital na produção de milho (DUARTE, 2002).

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

## **2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico**

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes minerais críticos para a produção vegetal porque seu suprimento no solo é limitado. Cerca de 78 % da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>). No entanto, os organismos eucariontes e a maioria dos procariontes são incapazes de absorver o N<sub>2</sub> e convertê-lo a uma forma assimilável. Os dois átomos de N encontram-se unidos de maneira muito estável por uma tripla ligação. Por esse motivo, para que o N<sub>2</sub> possa ser convertido a uma forma assimilável, é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial) ou a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica).

A fixação industrial do N<sub>2</sub>, chamada de processo Harber-Bosch, utiliza temperatura em torno de 400-600 °C e pressões em torno de 100-200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético. Já a fixação biológica do N<sub>2</sub> ocorre através do complexo enzimático, denominado nitrogenase, presente apenas em alguns organismos procariontes. Do ponto de vista energético, ela também é dispendiosa para o organismo que a realiza, pois utiliza energia celular na forma de ATP. No entanto, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica.

Estima-se que a fixação biológica contribua com a maior parte do N fixado anualmente - 175 milhões de toneladas, ou seja, 65 % do total, o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

A utilização de fertilizantes nitrogenados (orgânicos ou minerais) é causa de grande preocupação devido aos seus efeitos negativos sobre o ambiente e, conseqüentemente, a saúde humana. A maior preocupação refere-se ao movimento dos nitratos através do solo para a água, tanto superficial quanto subterrânea. Nos últimos anos, análises de amostras de água nos Estados Unidos têm mostrado níveis excessivos de nitrato em torno de  $10\text{mg L}^{-1}$ . A exposição prolongada a concentrações maiores que  $10\text{mg L}^{-1}$  de nitrato pode provocar deficiência de oxigênio no sangue, a qual é chamada de metahemoglobinemia (HOEFT, 1990).

Uma das possíveis soluções para a diminuição nas aplicações de fertilizantes nitrogenados nos cultivos é ampliar os estudos de interação planta bactéria diazotrófica, para sua melhor exploração, tornando os sistemas agrícolas mais sustentáveis e produtivos.

### 2.3 Bactérias Diazotróficas

No sistema natural são encontrados diversos microrganismos que contêm o complexo enzimático da nitrogenase, portanto, fixadores de N. Estão presentes nos mais diversos ecossistemas como o solo, as plantas, a água, etc., ocorrendo de forma livre ou em interações de diversas formas como a realizada de forma associativa.

As poáceas são capazes de se associar com diversas espécies de bactérias diazotróficas que colonizam desde as raízes até as folhas, na região da rizosfera até o interior do tecido vegetal. Neste segundo caso, as bactérias são chamadas endofíticas e acredita-se que estas sejam as principais responsáveis pelo ganho de N através da FBN observado em diversas culturas. A divisão do termo endofítico em facultativo e obrigatório foi proposto para distinguir respectivamente, estirpes capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior de raiz e com sobrevivência no solo, das que não sobrevivem no solo, mas colonizam o interior e parte aérea dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997). Tais endófitos apresentam grande potencial na FBN devido à sua habilidade em colonizar a planta como um todo e estabelecer-se dentro de nichos protegidos do oxigênio ou de outros fatores, podendo expressar seu potencial para fixação de nitrogênio em grau máximo (KENNEDY et al., 1997).

A descoberta de bactérias endofíticas colonizando plantas de cana-de-açúcar em populações elevadas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; REIS et al., 1994), *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, algumas espécies de *Azospirillum* spp. e *Burkholderia* (BALDANI et al., 1997), dificultam o entendimento da associação particular de cada espécie para o desenvolvimento da cultura. No entanto, sabe-se que as associações ocorrem em diferentes graus de interação, e em muitos casos estão relacionadas à especificidade de interação entre as características genéticas microbianas e da planta hospedeira (OLIVARES et al., 1997; BASHAN & HOLGUIM, 1997). Bactérias diazotróficas com baixa especificidade, colonizam geralmente as regiões superficiais do vegetal, como ocorre com *Azospirillum*, endófito facultativo. As bactérias que colonizam preferencialmente tecidos vegetais internos, endófitos obrigatórios como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Burkholderia* spp., geralmente possuem baixa sobrevivência no solo e um espectro restrito de plantas hospedeiras (BALDANI et al. 1997).

A capacidade de colonização dos tecidos internos das plantas por algumas bactérias, pode conferir a estas uma vantagem ecológica sobre as bactérias que podem apenas colonizar plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas proporcionam um ambiente mais uniforme e protegido para os microrganismos que a superfície onde estão expostas a

condições ambientais extremas como temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana, que são os fatores mais limitantes à sobrevivência das bactérias ao longo do tempo (COCKING, 2003).

Diante destas diversas vantagens, as bactérias de vida livre e rizosféricas perderam importância e a maior parte das pesquisas está direcionada aos endofíticos. Dentre eles estão os gêneros *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. que possuem ampla distribuição e serão abordados com maiores detalhes neste trabalho.

### 2.3.1 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi estabelecido por BALDANI et al. (1986) como bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às raízes de milho, sorgo e arroz. Nessa época, o gênero consistia apenas da espécie *H. seropedicae*, atualmente compreende mais oito espécies descritas, *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996a), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003), *H. clorophenolicum*, *H. putei*, *H. huttiense* e *H. autotrophicum* (DING & YOKOTA, 2004) e *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2006). Entre as nove espécies descritas acima, apenas as quatro primeiras são fixadoras de nitrogênio.

*H. seropedicae* foi a primeira espécie descrita do gênero, isolada de raízes lavadas e desinfestadas superficialmente de milho, sorgo, e arroz (BALDANI et al., 1986). Mais tarde foi isolada de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (BALDANI et al., 1996a), de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeiras (CRUZ et al., 2001), detectada em capim elefante (REIS et al., 2000), e isolada em associação com arroz inundado (RODRIGUES, 2004; BRASIL, 2005).

*H. seropedicae* é a espécie que possui maior distribuição e ocorrência dentre as espécies diazotróficas endofíticas estudadas. Esta bactéria tem baixa sobrevivência, quando inoculada em solo natural ou esterilizado e monitorado por contagem em meio JNFb semi-sólido (OLIVARES, et al., 1996). Os autores, entretanto, conseguiram re-isolar esta bactéria, quando sementes de sorgo desinfestadas superficialmente foram germinadas neste solo. A população de bactérias diazotróficas presentes nas plântulas foi avaliada em meio semi-sólido JNFb, sugerindo que a bactéria pode estar em estágio viável mas não cultivável no solo.

*H. rubrisubalbicans* pertencia ao gênero *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991), e foi reclassificada por BALDANI et al. (1996a). Tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raízes da planta espontânea *Digitaria insularis*, crescida no interior da plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996) e foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Esta bactéria tem ocorrência mais restrita que a *H. seropedicae* e pode causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462.

*H. frisingense* foi descrita recentemente isolada de amostras de tecido de raízes e colmos de diversos genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) coletados no Brasil, e das poáceas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (KIRCHHOF et al., 2001). Não há relatos de ocorrência em estudos posteriores. A mais nova espécie de bactéria diazotrófica descrita para o gênero *Herbaspirillum* é o *H. lusitanum*, que foi isolada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* em Portugal (VALVERDE et al., 2003).

Inúmeros experimentos foram conduzidos com inoculação de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, principalmente com a espécie *H. seropedicae*, pela sua ocorrência em maior número de plantas estudadas.

### 2.3.2 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* é constituído por 37 espécies e somente nove apresentam descrita a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* apresentam ampla distribuição, se associam com plantas não leguminosas e formam nódulos em leguminosas.

A capacidade de algumas estirpes de *B. cepacia* isoladas de rizosfera, fixarem nitrogênio atmosférico, foi relatada em 1994 (BEVIVINO et al., 1994). Porém, a primeira espécie de *Burkholderia* diazotrófica descrita foi *B. vietnamiensis*, isolada da rizosfera de plantas de arroz crescidas no Vietnã (GILLIS et al., 1995). Posteriormente, ela foi encontrada associada com milho e café em diferentes regiões do México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001).

Novos isolados foram obtidos de cereais como milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1999), bem como de frutas (CRUZ et al., 2001) crescidas no Brasil. Outra espécie, *B. kururiensis*, representada por somente a estirpe KP23, foi originada de amostras de sedimentos coletadas numa área contendo tricloetileno no Japão (ZHANG et al., 2000). A sua capacidade de fixar nitrogênio foi demonstrada por ESTRADA DE LOS SANTOS et al. (2001), porém não há informação sobre a ocorrência dessa espécie em associação com plantas. Outras três novas espécies diazotróficas foram descritas: *B. tuberum* e *B. phymatum*, isoladas de nódulos de duas leguminosas tropicais, *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum* respectivamente (VANDAMME et al., 2002); e *B. mimosarum* (CHEN et al., 2006) isolada de diferentes mimosas no Brasil e na Venezuela.

As quatro espécies de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* descritas mais recentemente colonizando poáceas são *B. unamae*, *B. tropica*, *B. xenovorans* e *B. silvatlantica*. A espécie *B. unamae* foi isolada da rizosfera de plantas de milho, café e cana-de-açúcar crescidas no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). *B. tropica* (REIS et al., 2004) foi isolada de cana em meio LGI-P no Brasil. A espécie *B. xenovorans* foi descrita com apenas três isolados, obtidos de solo contaminado com policlorinato bifenil (PCB) nos EUA, sangue humano na Suécia e café no México (GORIS et al., 2004). A bactéria descrita *B. silvatlantica* foi isolada de plantas de cana-de-açúcar, abacaxi e milho cultivadas no Brasil (PERIN et al., 2006).

A inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* em plantas de arroz contribuiu com 31 % do total de nitrogênio da planta, tendo aumentado 69 % da biomassa das plantas (BALDANI et al., 2000). Contribuição também foi observada com inoculação de *Burkholderia* spp. em plantas de bananeiras (WEBER et al., 2000).

Diversos trabalhos têm mostrado que bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes em inúmeras plantas. Embora exista um rigoroso sistema de segurança em torno deste gênero, já que foi detectada a presença de *B. cepacia* em pacientes com Fibrose Cística, o conhecimento de sua ecologia é importante para melhor exploração e manejo do sistema.

## 2.4 Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Milho

O milho possui uma via fotossintética (via C4) mais eficiente que as leguminosas, e com isso é capaz de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores. Esse tipo de planta pode mais facilmente dispensar fontes energéticas para a alimentação de bactérias diazotróficas e o processo energeticamente caro da conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em formas combinadas utilizáveis pelas plantas (DÖBEREINER, 1992).

Por isso, quando se tem uma planta com uma estratégia fisiológica tão competente, provavelmente pouco será notado das possíveis contribuições a partir das interações destas com microrganismos e, qualquer real contribuição numa cultura plantada em tão larga escala, facilmente se constitui em dividendos para a agricultura.

Em regiões de clima tropical e subtropical, as temperaturas do solo, durante todo o ano, são mais favoráveis aos processos microbiológicos em geral. No entanto, a rápida decomposição da matéria orgânica e os altos níveis pluviais que favorecem a desnitrificação e lixiviação de compostos nitrogenados contribuem para a dependência da aplicação de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1992). Mesmo dependente, devido à falta de subsídios para fertilizantes, o Brasil aplica níveis de  $N\ ha^{-1}$  abaixo do que é assimilado pela planta. Isso acarretou, ao longo de décadas, em diversas culturas, a seleção natural ou melhoramento de genótipos com capacidade de se associarem com bactérias fixadoras de  $N_2$ , obtendo-se assim grande parte do N necessário através da FBN. Talvez, por esta razão, o Brasil tenha assumido a liderança nas pesquisas sobre produção com níveis muito baixos de adubação nitrogenada, sem diminuição da produtividade. Um exemplo disto é a cana-de-açúcar, que mesmo com aplicações mínimas de fertilizante nitrogenado, mantém sua nutrição nitrogenada sem esgotamento do solo.

Em plantas de milho, a maioria dos experimentos foi conduzida com a inoculação de *Azospirillum*, mostrando variáveis aumentos de aproximadamente 25 % (KENNEDY et al., 2004). Esta contribuição das bactérias é maior quando a planta recebe doses variáveis de fertilizante nitrogenado (DOBBELAERE et al., 2003).

Inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* foram lançados no mercado mundial. Nos Estados Unidos um produto com o nome de Azo-Green<sup>TM</sup> foi produzido e recomendado para aumentar o vigor da semente, aumento do sistema radicular, resistência a geada e uma melhoria geral da saúde da planta (FALLIK & OKON, 1996). Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto com nome comercial de Zea-Nit<sup>TM</sup>, contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (Br17) comercializado na forma de mistura com vermiculita ou em forma líquida. Segundo os fabricantes, este produto reduziria a aplicação de 30 a 40 % do nitrogênio necessário à cultura (OKON et al., 1994).

No México, foi desenvolvido um inoculante denominado “Fertilizante para milho”, e tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5000 ha no ano de 1993 (PAREDES-CARDONA et al., 1988 e CABALLERO-MELLADO et al., 1992). A Argentina lançou um produto denominado Graminante<sup>TM</sup> a base de pó de carbonato de cálcio contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20 % (OKON et al., 1994).

GARCÍA DE SALAMONE et al. (1996) testaram quatro genótipos de milho quanto à contribuição da FBN, inoculando com *Azospirillum* e utilizando solo marcado com  $^{15}N$ . De acordo com os resultados de  $^{15}N$ , ocorreu contribuição significativa da FBN nos genótipos Dekalb 4D 70 e CMS 22 plantados na Argentina. RIGGS et al. (2001) observaram que os sintomas de deficiência de N não foram amenizados por nenhuma das 23 estirpes de bactérias diazotróficas usadas em plantas de milho, tanto em vaso como no campo, mas não mediram a contribuição da FBN.

O número de trabalhos com inoculação de *Azospirillum* diminuiu nos últimos anos, pois apresentavam respostas positivas, porém variáveis. Mais interesse foi dado a bactérias endofíticas, como os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Os altos números nos tecidos das plantas de milho tornaram estas bactérias promissoras para o suprimento de nitrogênio nos sistemas agrícolas e serão avaliadas neste estudo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para seleção de estirpes de bactérias diazotróficas, promissoras para uso como inoculante para a cultura do milho, foram conduzidos experimentos em substrato esterilizado e não-esterilizado e em condições de campo.

#### 3.1 Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado

##### 3.1.1 Organismos e preparo do inóculo

Foram testados 49 isolados, que estão depositados na Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. Destes, 24 isolados pertencem ao gênero *Herbaspirillum* (Tabela 1) e 25 ao gênero *Burkholderia* (Tabela 2). Os isolados foram inicialmente crescidos em placas com meio de cultura sólido JMV (anexo) para *Burkholderia* e JNFb (DÖBEREINER et al., 1995) para *Herbaspirillum*, com o objetivo de verificar a pureza. Para obtenção do inoculante, colônias puras foram inoculadas no meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO, 1986) e multiplicadas por 24 horas a 30 °C à 175 rpm (rotações por minuto). Cada semente recebeu 1 mL da suspensão de concentração celular ajustada para  $10^8$ - $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>, numa densidade ótica igual a 1, lida no comprimento de onda  $\lambda = 436\text{nm}$  (SCHLOTTER et al., 1992).

**Tabela 1.** Lista dos isolados utilizados na seleção de estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* aplicadas como inoculante para o milho.

Isolados	Sigla BR	<i>Herbaspirillum</i> spp.	Origem
HRC80	11198	<i>H. seropedicae</i>	raízes de cana-de-açúcar
ZAE67 <sup>T</sup>	11175	<i>H. seropedicae</i>	arroz
ZS12	11176	<i>H. seropedicae</i>	sorgo
ZAE78 <sup>T</sup>	11177	<i>H. seropedicae</i>	milho
ZMS152	11178	<i>H. seropedicae</i>	raiz de milho
ZM176	11179	<i>H. seropedicae</i>	raiz de milho
ZAE95	11181	<i>H. seropedicae</i>	arroz
83IIIA	11182	<i>H. seropedicae</i>	raiz de milho
HRC54	11335	<i>H. seropedicae</i>	raízes de cana-de-açúcar
ZAE94	11417	<i>H. seropedicae</i>	arroz
ZAL102	11421	<i>H. seropedicae</i>	arroz
HCC101	11510	<i>H. seropedicae</i>	colmo de cana-de-açúcar
HRE	12230	<i>H. seropedicae</i>	raízes de cana-de-açúcar
GSF30 <sup>T</sup>	-	<i>H. frisingensi</i>	Frising (Alemanha)
GSF28	-	<i>H. frisingensi</i>	Frising (Alemanha)
P74	-	<i>H. frisingensi</i>	Frising (Alemanha)
M1	11191	<i>H. rubrisubalbicans</i>	folha de cana-de-açúcar
M4 <sup>T</sup>	11192	<i>H. rubrisubalbicans</i>	folha de cana-de-açúcar
M6	11194	<i>H. rubrisubalbicans</i>	folha de cana-de-açúcar
HCC103	11504	<i>H. rubrisubalbicans</i>	colmo de cana-de-açúcar
10	11765	<i>H. rubrisubalbicans</i>	arroz
B4362	12229	<i>H. rubrisubalbicans</i>	folha de cana-de-açúcar
84b	12232	<i>H. frisingensi</i>	capim elefante
16	12233	<i>H. rubrisubalbicans</i>	arroz

**Tabela 2.** Lista dos isolados utilizados na seleção de estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Burkholderia* aplicadas como inoculante para o milho.

Isolados	Sigla BR	<i>Burkholderia</i> sp.	Origem
KP23 <sup>1</sup>	-	<i>B. kururiensis</i>	aquífero poluído (Japão)
M130	11340	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
M209	11345	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
100	11815	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
109	11818	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
120	11821	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
35	12234	<i>Burkholderia</i> sp.	arroz
PPe5	11363	<i>B. tropica</i>	cana-de-açúcar
Ppe6	11364	<i>B. tropica</i>	cana-de-açúcar
Ppe7	11365	<i>B. tropica</i>	cana-de-açúcar
Ppe8 <sup>T</sup>	11366	<i>B. tropica</i>	cana-de-açúcar
TVV75 <sup>T</sup>	-	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz (Vietnã)
75	11807	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz
102	11816	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz
121	11822	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz
139	11826	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz
41	12149	<i>B. vietnamiensis</i>	arroz
3 m	11905	<i>B. silvatlantica</i>	milho
78 m	11909	<i>B. silvatlantica</i>	milho
85 m	11911	<i>B. silvatlantica</i>	milho
89 m	11914	<i>B. silvatlantica</i>	milho
90 m	11915	<i>B. silvatlantica</i>	milho
PPCRr1	12164	<i>B. silvatlantica</i>	cana-de-açúcar
PPCRr3	12165	<i>B. silvatlantica</i>	cana-de-açúcar
PPCRr8	12166	<i>B. silvatlantica</i>	cana-de-açúcar

### 3.1.2 Condições experimentais

Foram conduzidos seis experimentos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica em 2005 e 2006. Para o plantio foram utilizadas caixas plásticas preenchidas com 15 kg de areia + vermiculita esterilizado (2:1; v/v). Com base nos resultados da análise química (Tabela 3) foi feita a correção da fertilidade deste substrato conforme recomendação de aplicação do Manual de Adubação do Estado do Rio de Janeiro (DE-POLLI, 1988) com adubação equivalente a 1 ton ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico, para elevação do nível do cálcio e do magnésio, 80 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2 mg kg<sup>-1</sup> de Superfosfato Simples) e 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (0,3 mg kg<sup>-1</sup> de KCl). Posteriormente, em cada caixa foram plantadas 4 sementes a 3 cm de profundidade, sendo que os genótipos de milho utilizados foram o híbrido triplo SHS5050 e a variedade BRS Sol da Manhã. Estes dois genótipos foram escolhidos por apresentarem respostas contrastantes a adubação mineral. Todos os tratamentos inoculados receberam adubação equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N (10 mg kg<sup>-1</sup>) e os controles foram uma testemunha sem o inoculante e sem adubação nitrogenada (T0) e duas testemunhas não inoculadas, mas adubadas com o equivalente a 20 (10 mg kg<sup>-1</sup>-T20) e 40 (20 mg kg<sup>-1</sup>-T40) kg ha<sup>-1</sup> de N. A primeira aplicação de fertilizante nitrogenado foi realizada 10 dias após o plantio e a segunda (metade da dose) aos 20 dias. A coleta final foi realizada aos 40 dias após o plantio. A fonte de N utilizada foi a uréia.

**Tabela 3.** Análise química do substrato utilizado.

pH em	Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K
água	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>		
4,7	0,2	0,9	n.d.	n.d.	3	10

Al, Ca, Mg, P e K – Embrapa – SNLCS (1996)

Foi avaliado o acúmulo de biomassa seca (MS) das raízes e da parte aérea das plantas aos 40 dias após o plantio, além do comprimento e área radicular, medidos através do programa de análise de raízes desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária (SIARCS 3.0). Também foi avaliado o teor de N na parte aérea, determinado pela digestão de Kjeldahl, seguida de destilação e titulação, conforme descrito em BREMNER & MULVANEY (1982).

### 3.1.3 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet), em seguida foram feitas análises de variância com auxílio do programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003) utilizando o teste de Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade.

## 3.2 Seleção de Estirpes em Substrato Não Esterilizado

### 3.2.1 Organismos e preparo do inóculo

As estirpes que se destacaram nos experimentos em substrato esterilizado foram crescidas e inoculadas nas mesmas condições citadas no item 3.1.1.

### 3.2.2 Condições experimentais

Foram conduzidos três experimentos utilizando as mesmas caixas plásticas da etapa anterior, sendo que foram preenchidas com 15 kg de terra proveniente dos primeiros 20 cm do horizonte A de um Planossolo (série Ecologia) pobre em nitrogênio. A correção da fertilidade do substrato foi feita com base nos resultados da análise química (Tabela 4), foi feita a correção da fertilidade deste substrato conforme recomendação de aplicação do Manual de Adubação do Estado do Rio de Janeiro (DE-POLLI, 1988) com adubação equivalente a 60 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1,5 mg kg<sup>-1</sup> de Superfosfato Simples) e 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (0,3 mg kg<sup>-1</sup> de KCl). Posteriormente, em cada caixa foram plantadas 2 sementes a 3 cm de profundidade, sendo que os genótipos de milho utilizados foram o híbrido triplo SHS5050 e a variedade BRS Sol da Manhã.

Os tratamentos inoculados, os controles, o parcelamento da adubação, a coleta e as variáveis avaliadas foram da mesma forma descrita no item 3.1.2.

**Tabela 4.** Análise química do substrato utilizado.

pH em	Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K
água	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>		
4,9	0,2	2,7	1,1	1,6	14	24

Al, Ca, Mg, P e K – Embrapa – SNLCS (1996)

### 3.2.3 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o mesmo do item 3.1.3.

### Avaliação da Eficiência da Estirpe Seleccionada em Condições de Campo

A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 apresentou a maior contribuição em ambos os genótipos de milho para a variável biomassa seca de parte aérea nos experimentos em condições de casa de vegetação. Portanto, foi selecionada para teste em condições de campo.

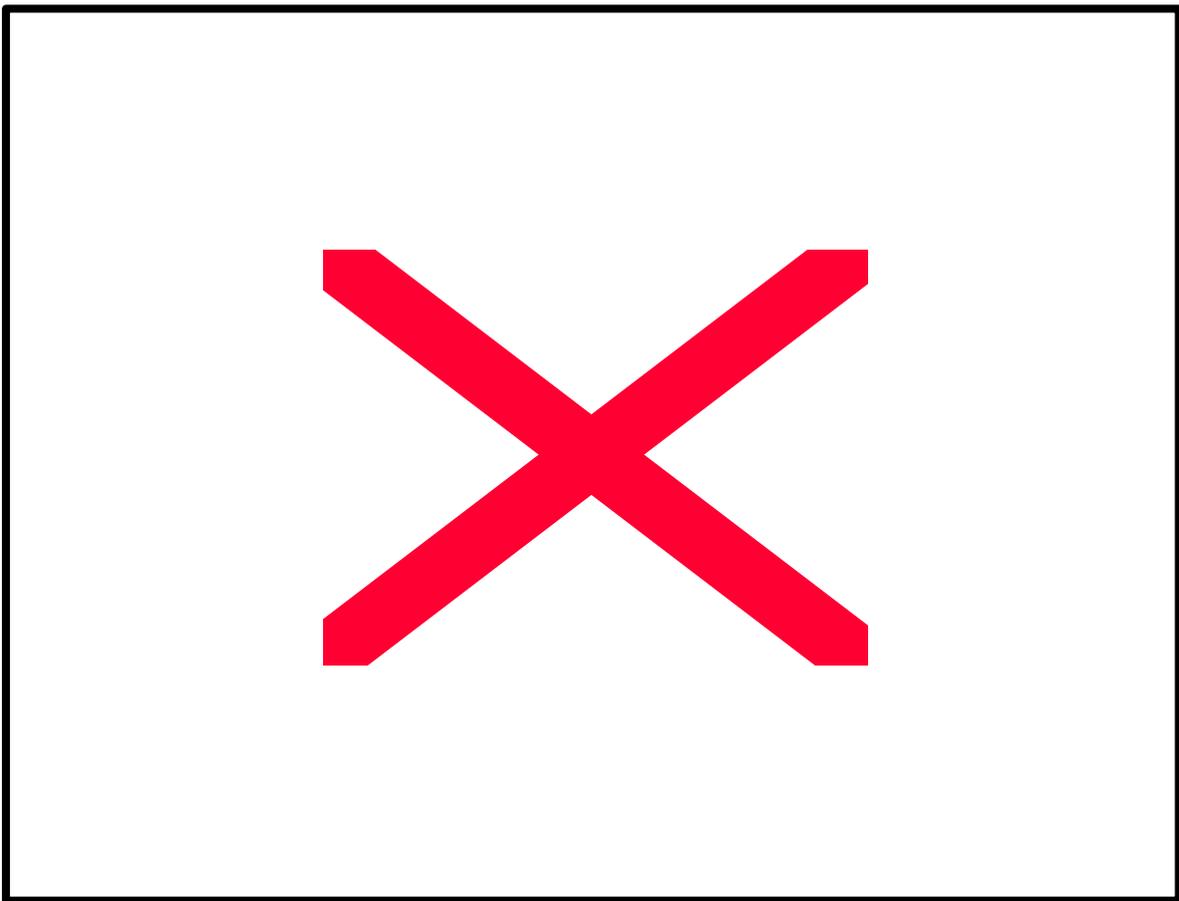
### 3.3.1 Localização da área de estudo

Os experimentos foram implantados sobre um Planossolo Háplico, na área experimental da Embrapa Agrobiologia em Seropédica. A correção da fertilidade do solo foi feita com base nos resultados obtidos na análise química (Tabela 5), conforme recomendação de aplicação do Manual de Adubação do Estado do Rio de Janeiro (DE-POLLI, 1988) com 80 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (200 g de Superfosfato Simples por linha de 6 m) e 20 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (17 g de KCl por linha de 6 m). Foram implantados dois experimentos, um na safrinha, na época seca, e outro na safra, época das águas. As temperaturas médias e precipitações variaram muito no decorrer dos experimentos (Figura 1).

**Tabela 5.** Análise química do solo onde foram implantados os experimentos.

pH em	Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K
água	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>		
5,6	0	3,1	1,9	1,1	4,8	48,4

Al, Ca, Mg, P e K – Embrapa – SNLCS (1996)



**Figura 1.** Médias mensais de temperatura e precipitação pluviométrica da área de estudo no período de maio de 2005 a maio de 2006. Dados fornecidos pela Pesagro-Rio (Estação Experimental de Seropédica – RJ).

### **3.3.2 Inóculo e inoculação**

A estirpe selecionada foi inicialmente crescida em placa com meio de cultura sólido JNFb. Posteriormente, 2 colônias puras foram inoculadas no meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO, 1986) por 24 horas a 30 °C à 175 rpm. Após esta etapa, 100 µL da suspensão celular foi inoculada em frascos contendo 75 mL do mesmo meio Dyg's, e multiplicadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o crescimento, a densidade ótica da suspensão de células foi ajustada para 1, a 436 nm (SCHLOTTER et al., 1992) para se obter  $10^8$ - $10^9$  células mL<sup>-1</sup>.

Posteriormente ao ajuste celular, foi feita a inoculação de 75 mL da suspensão bacteriana em saquinhos de polipropileno contendo 175 g de turfa, preparada segundo STRALIOTTO (2000), sendo homogeneizados em seguida. Logo após a inoculação, a turfa maturou a 30 °C por 24 h. Após este período, as sementes foram cobertas com uma solução de polvilho a 10 %, depois recobertas com a turfa inoculada na proporção de 250 g de inoculante turfoso para 10 kg de sementes de milho.

### **3.3.4 Condições e delineamentos experimentais**

O experimento na safrinha foi implantado em 24 de maio de 2005 (safrinha) e o experimento na safra em 21 de dezembro de 2005 (safra), ambos colhidos em torno de 120

dias após plantio e molhados uma vez por semana nas épocas com menores precipitações pluviométricas. A densidade de plantio utilizada foi de 5 plantas m<sup>2</sup>.

Os genótipos utilizados no experimento safrinha foram os híbridos triplo e simples SHS 5050 e BR 1030, respectivamente, e as variedades BRS 106 e BRS Sol da Manhã. No experimento safra só não foi utilizado o genótipo BRS Sol da Manhã dentre os citados.

Os genótipos foram escolhidos por diferirem quanto à necessidade de fertilidade do solo. Os genótipos BRS 106 e BRS Sol da Manhã são indicados para solos de baixa fertilidade e os genótipos SHS 5050 e BR1030 são indicados para solos de fertilidade boa à moderada.

Os experimentos safrinha e safra tiveram 6 repetições por tratamento, o delineamento fatorial em blocos ao acaso (Figuras 6 e 7) e parcelas com 5 linhas de 6 m de comprimento e 1 m de espaçamento entre linhas. A área útil de cada parcela foi de 10 m<sup>2</sup>.

Os fatores genótipo e inoculação foram combinados com o fator nível de adubação nitrogenada, dando origem aos tratamentos. Os níveis de adubação nitrogenada foram 0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup>, parceladas em duas aplicações, na forma de uréia.

As variáveis analisadas foram: produtividade (massa de grãos secos a 14 % de umidade – kg ha<sup>-1</sup>), teor de N no grão, número de plantas, número de espigas por planta (milho). O teor de N foi determinado pela digestão conforme descrito em BREMNER & MULVANEY (1982).

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet), em seguida foram feitas análises de variância com auxílio do programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003) num triplo fatorial onde para o fator inoculação foi utilizado o teste de Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 10 % de probabilidade, para o fator nível de adubação foi utilizado o teste de regressão a 5 % de probabilidade e para o fator genótipo, o teste Scott-Knott, a também 5 % de probabilidade.

**Figura 6.** Desenho experimental dos tratamentos do experimento safrinha de 2005 em um bloco.

G1N0I0	G1N0IH	G1N40I0	G1N40IH
G1N80I0	G1N80IH	G2N0I0	G2N0IH
G2N40I0	G2N40IH	G2N80I0	G2N80IH
G3N0I0	G3N0IH	G3N40I0	G3N40IH
G3N80I0	G3N80IH	G4N0I0	G4N0IH
G4N40I0	G4N40IH	G4N80I0	G4N80IH

G1, G2, G3 e G4- genótipos utilizados; N0, N40 e N80- Sem adubação e doses de adubação nitrogenada em kg ha<sup>-1</sup>; I0, IH- Sem inoculação e Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11417).

**Figura 7.** Desenho experimental dos tratamentos do experimento safra de 2005/2006 em um bloco.

G1N0I0	G1N0IH	G1N40I0
G1N40IH	G1N80I0	G1N80IH
G2N0I0	G2N0IH	G2N40I0
G2N40IH	G2N80I0	G2N80IH
G3N0I0	G3N0IH	G3N40I0
G3N40IH	G3N80I0	G3N80IH

G1, G2 e G3- genótipos utilizados; N0, N40 e N80- Sem adubação e doses de adubação nitrogenada em kg ha<sup>-1</sup>; I0, IH, IB e IM- Sem inoculação e Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11417).

### 3.4 Quantificação da FBN

Foram realizadas amostragens nos experimentos de campo conduzidos visando quantificar a contribuição de FBN na cultura do milho.

A quantificação da FBN para a cultura do milho foi realizada através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  a partir da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  das plantas (SHEARER & KOHL, 1986). Esta técnica pode ser empregada uma vez que o N do solo é enriquecido em  $^{15}\text{N}$  em comparação ao  $\text{N}_2$  do ar. A planta não fixadora apresenta uma abundância natural de  $^{15}\text{N}$  muito semelhante a do N disponível do solo, enquanto que a planta fixadora de  $\text{N}_2$  apresenta valores de abundância de  $^{15}\text{N}$  que mais se aproximam de zero quanto maior for a atividade fixadora das bactérias a elas associadas.

Para a estimativa da FBN através da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  utiliza-se a seguinte expressão:

$$P = 100 \frac{(\delta^{15}\text{N planta não fixadora}) - (\delta^{15}\text{N planta fixadora})}{(\delta^{15}\text{N não fixadora} - B)}$$

Onde, P é a % de fixação biológica de N,  $\delta^{15}\text{N}$  não fixadora é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  encontrado na planta testemunha coletadas em cada parcela experimental e B é o fator de correção do fracionamento isotópico ocorrido pelas plantas de milho crescendo exclusivamente dependente da FBN (Neste estudo, foi considerado igual a zero, como proposto por BODDEY et al., 2001).

Cada parcela teve uma linha plantada para a quantificação da contribuição de FBN. Para análise da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foi feita a coleta da parte aérea, composta por folha e colmo, na metade da fase de enchimento dos grãos. Esta parte aérea foi seca, moída, amostrada na parcela dos tratamentos testemunha absoluta e testemunha inoculada (sem N) nos genótipos de milho SHS 5050 e BRS Sol da Manhã, no experimento safrinha e genótipos de milho SHS 5050 e BRS 106, no experimento safra.

No experimento safrinha, as plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha. Já, no experimento safra foram coletadas três testemunhas em cada repetição dos tratamentos testados, as quais foram utilizadas para as estimativas de FBN. Foram elas: *Cyperus rotundus* (“tiririca”), *Portulaca oleracea* (“beldroega”) e *Eleusine indica* (“capim pé-de-galinha”).

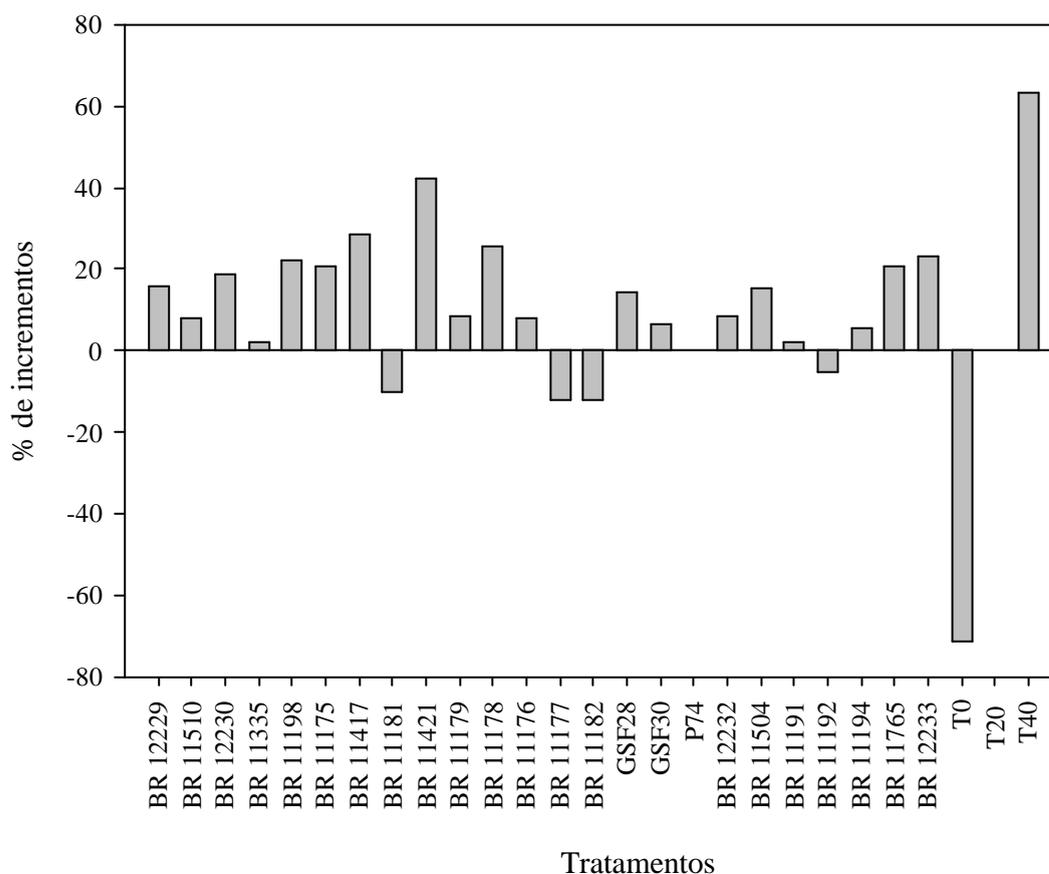
As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa Delta Plus da Embrapa Agrobiologia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado

Para iniciar a seleção de estirpes foram feitos experimentos em vaso contendo substrato esterilizado, visando avaliar o efeito das bactérias inoculadas. Alguns isolados mostraram-se promissores para os estudos de inoculação já que foram mais eficientes que o controle com 10 mg kg de N. Estas diferenças foram observadas principalmente no acúmulo de biomassa seca de parte aérea. Devido a isto, foram calculados percentuais de incrementos ou valores relativos de acúmulo de biomassa seca sobre o controle não inoculado e adubado com a mesma dose de N que os tratamentos inoculados (20 kg ha<sup>-1</sup> de N). Optou-se pela utilização de valores relativos para facilitar a avaliação de diversos experimentos juntos.

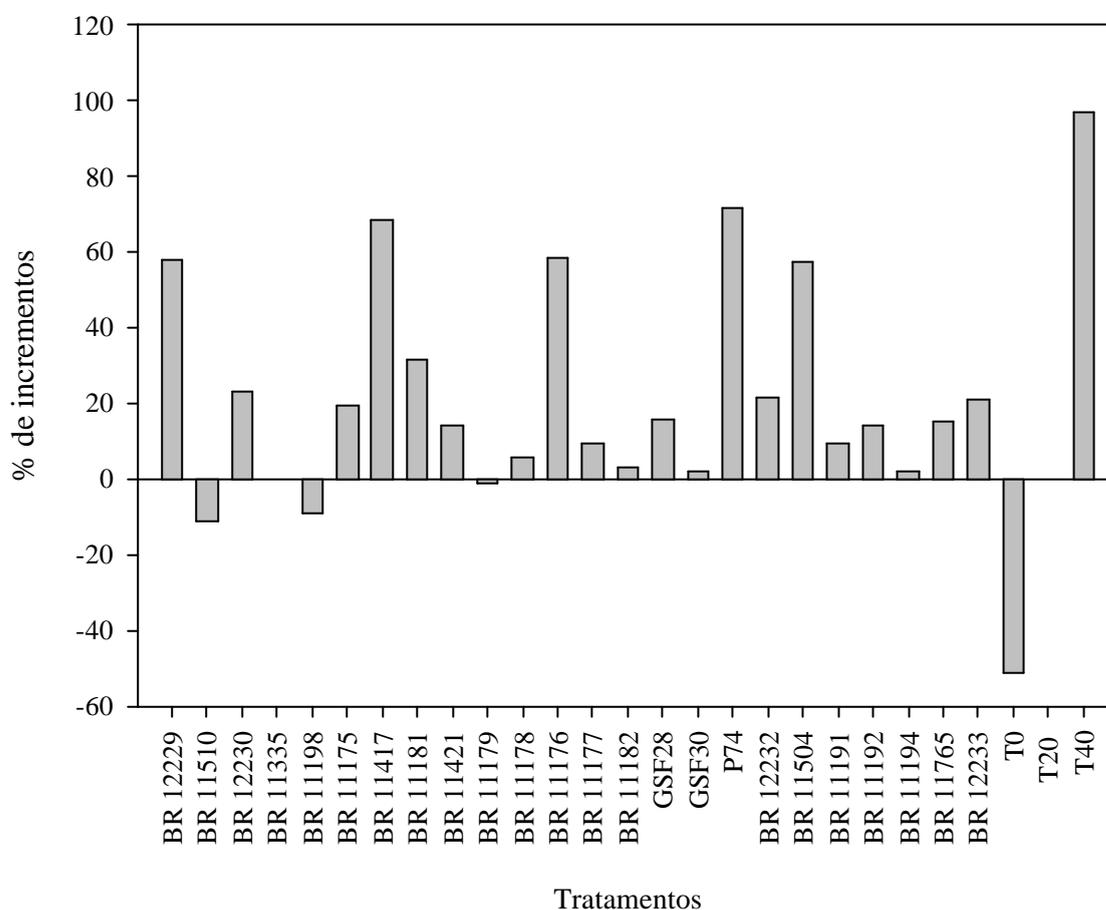
Nesta fase, no híbrido SHS 5050, a inoculação com estirpes de *Herbaspirillum* spp. mostrou valores relativos de biomassa seca de parte aérea que variaram de -12,14 (BR 11177 e BR 11182) a 42,45 % (BR 11421) (Figura 2).



**Figura 2.** Valores relativos (%) de biomassa seca de parte aérea dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N), na seleção em substrato esterilizado, em milho híbrido SHS 5050 - Médias de 6 experimentos. Dados originais em anexo.

Os maiores valores foram observados em plantas inoculadas com a espécie *H. seropedicae*. A inoculação com as estirpes de *H. seropedicae* tem sido alvo de diversas pesquisas e já mostrou incremento significativo no acúmulo de massa fresca de raízes e parte aérea em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (OLIVARES, 1997, OLIVARES et al. 2002), aumentos significativos de produção de grãos em arroz (GUIMARÃES, 2000) e aumentos na nutrição mineral nitrogenada e promoção de crescimento das plantas de milho (RIGGS et al. 2001).

Na variedade BRS Sol da Manhã, a inoculação com estirpes de *Herbaspirillum* spp. apresentou valores relativos de biomassa seca de parte aérea entre -11,32 (BR 11510) e 71,70 % (P74) (Figura 3). Neste genótipo não foi notada uma prevalência de uma espécie, pois além da *H. seropedicae*, as espécies *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* também se sobressaíram. Também não foi observada correlação entre incremento de biomassa e origem dos isolados.

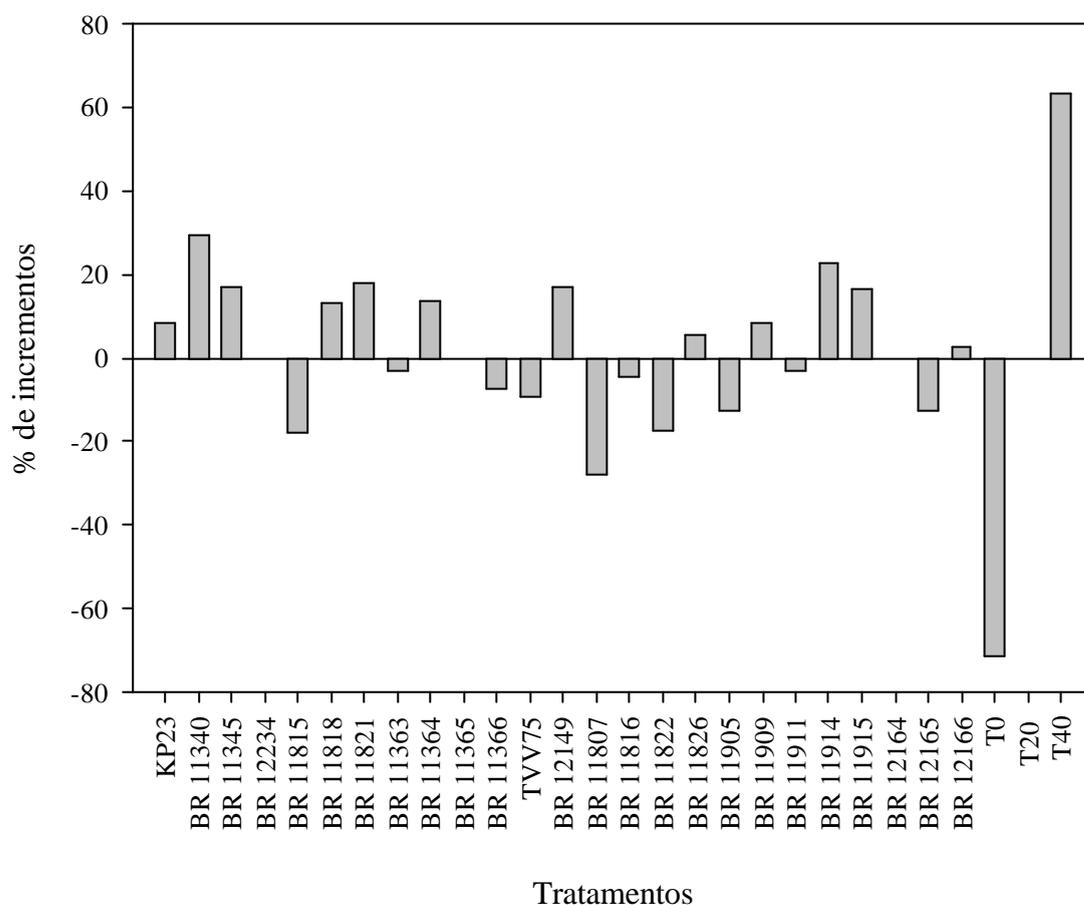


**Figura 3.** Valores relativos (%) de biomassa seca de parte aérea dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N), na seleção em substrato esterilizado, em milho variedade BRS Sol da Manhã - Médias de 6 experimentos. Dados originais em anexo.

No híbrido SHS 5050, a inoculação com estirpes de *Burkholderia* spp. mostrou valores relativos que variaram de -27,78 (BR 11807) a 29,63 % (BR 11340) (Figura 4).

A inoculação de estirpes do gênero *Burkholderia* promoveu menores valores de biomassa seca de parte aérea do que a inoculação com *Herbaspirillum*, e mesmo os incrementos foram de menor amplitude. Ainda neste genótipo, os isolados do gênero

*Burkholderia* testados, aqueles da espécie proposta *B. brasilensis*, apresentaram maiores incrementos na variável biomassa seca de parte aérea. Esta mesma espécie quando inoculada em plantas de arroz da variedade IR42, contribuiu com 31 % do total de nitrogênio da planta, tendo aumentado 69 % da biomassa das plantas (BALDANI et al., 2000) A cultivar de arroz IAC4440, em condições de campo, teve sua produção de grãos aumentada em torno de 50 % quando inoculada com a estirpe M209 (BR 11345) e o acúmulo de N nos grãos, aumentado em 90 % (GUIMARÃES, 2001). Também em condições de campo, trabalhando com arroz de sequeiro, variedade Guarani, a inoculação desta espécie de bactéria diazotrófica aumentou em 38 % a massa dos grãos secos em relação ao controle não inoculado.

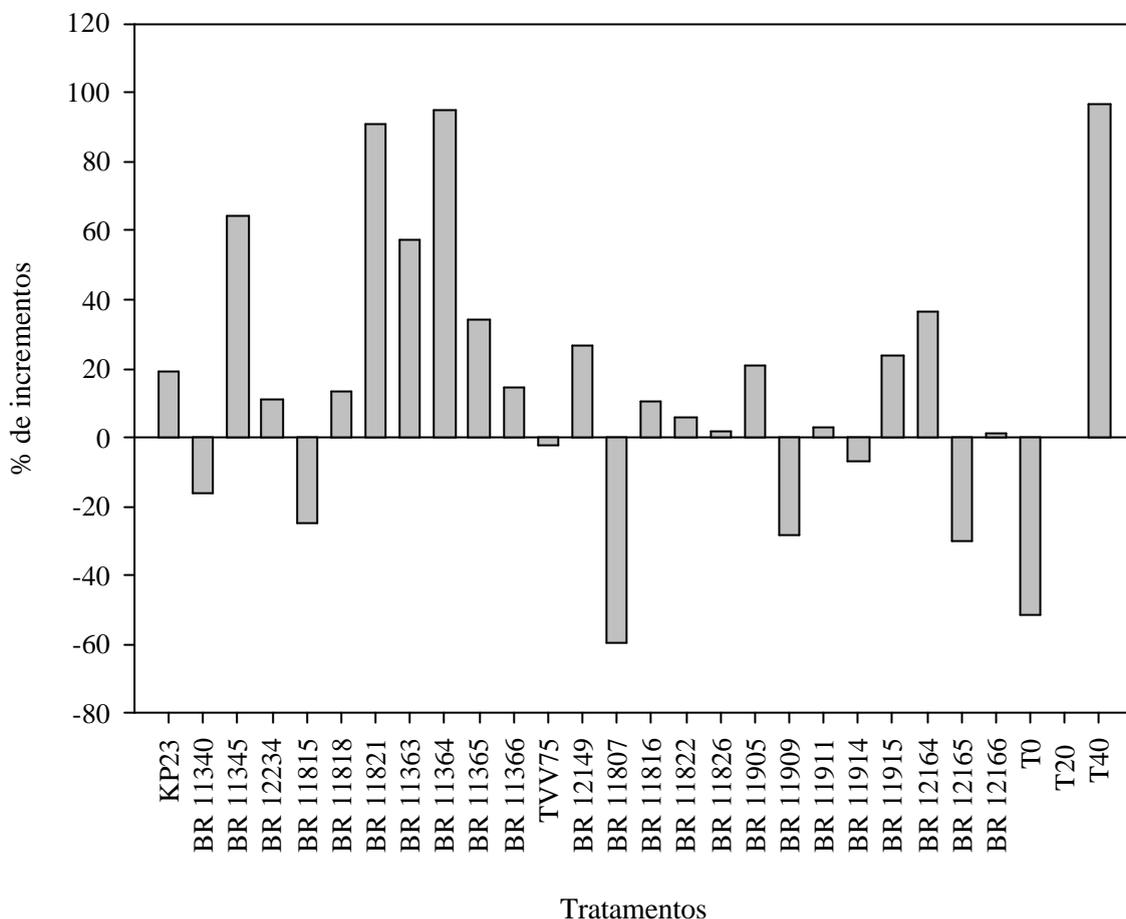


**Figura 4.** Valores relativos de biomassa seca dos tratamentos inoculados com *Burkholderia* spp. sobre a T20, (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N) na seleção em substrato esterilizado, em milho híbrido SHS 5050 - Médias de 6 experimentos. Dados originais em anexo.

Contribuições também foram observadas com a inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* na cultura da mandioca, onde a inoculação conjunta destes isolados com fungos micorrízicos arbusculares promoveu aumento da parte aérea e raízes em 50 e 105 %, respectivamente, em relação à inoculação do fungo isoladamente, e também se destacou em relação a outras espécies de bactérias diazotróficas inoculadas (BALOTA et al., 1997).

Na variedade BRS Sol da Manhã, a inoculação com estirpes de *Burkholderia* spp. apresentou valores relativos que variaram entre -59,43 (BR 11807) e 94,83 % (BR 11364) (Figura 5). A inoculação dos isolados da espécie *B. tropica* teve maiores incrementos, neste

genótipo, e as melhores foram isoladas de diferentes plantas. Várias respostas negativas continuaram a ser observadas na inoculação deste gênero.

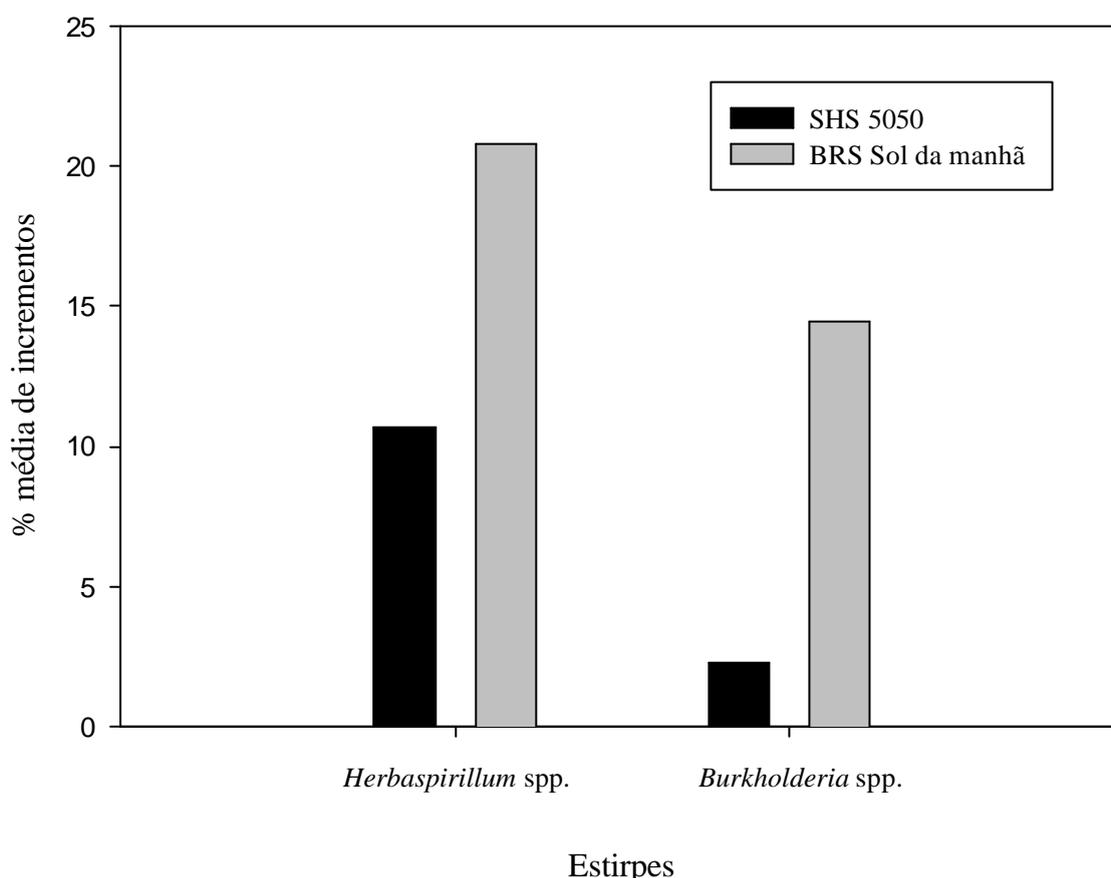


**Figura 5.** Valores relativos de biomassa seca dos tratamentos inoculados com *Burkholderia* spp. sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N), na seleção em substrato esterilizado, em milho variedade BRS Sol da Manhã - Médias de 6 experimentos. Dados originais em anexo.

Os incrementos na variedade BRS Sol da Manhã tiveram uma maior amplitude de resposta e foram maiores que os do híbrido (Figura 6). Quando se avaliam diferentes tipos de genótipos, como híbridos e variedades em diferentes condições ambientais um questionamento que surge é com relação à maior estabilidade dos materiais em função do grupo a que pertencem. BLECKER & LÉON (1988) comentam que a estrutura genética da população pode influenciar no resultado da interação genótipo x ambiente, uma vez que é esperado que genótipos heterozigotos sejam menos suscetíveis às variações ambientais que os homozigotos, e que populações heterogêneas sejam mais tolerantes que as homogêneas. Existem inúmeros trabalhos com a cultura do milho que permitem inferir não haver uma relação fixa quanto à homogeneidade ou heterogeneidade do material e sua estabilidade, pois é possível selecionar materiais mais estáveis em qualquer grupo: variedades ou híbridos (LEMONS, 1976; NASPOLINI FILHO, 1976; GOMES, 1990; MUNIZ, 1995, RIBEIRO et al., 2000; CARDOSO et al., 2003). O que se pode afirmar é que, dentre os dois genótipos testados, a variedade teve maior potencial de resposta nesta condição mais desfavorável,

atribuída ao substrato utilizado, que não favoreceu o acúmulo de biomassa nas plantas, indicando a maior adaptabilidade deste material a esta condição.

De maneira geral, a inoculação de isolados do gênero *Herbaspirillum*, resultou em maiores incrementos de biomassa do milho do que a inoculação de isolados do gênero *Burkholderia* (Figura 6). Isto pode ser atribuído à diferença no modo de infecção, colonização, estabelecimento endofítico e atividade em associação com a planta dos dois gêneros, sendo que o *Herbaspirillum* tem capacidade de estabelecimento endofítico (SCHLOTTER et al., 1994; BALDANI, 1996a; PERIN et al., 2003), colonizando preferencialmente tecidos vegetais internos, enquanto que *Burkholderia* coloniza mais superficialmente, com caráter rizosférico. Isto foi verificado em estudos de microscopia eletrônica em plântulas de arroz inoculadas com os isolados M130 e M209 de *Burkholderia* spp., que revelaram maior ocorrência de bactérias na rizosfera das raízes primárias e secundárias, com colonização de algumas células da epiderme das raízes e, em apenas alguns casos, foi observada a colonização do xilema (BALDANI, 1996b). Isso indica que esta bactéria coloniza provavelmente a rizosfera, e posteriormente, o interior das plantas.



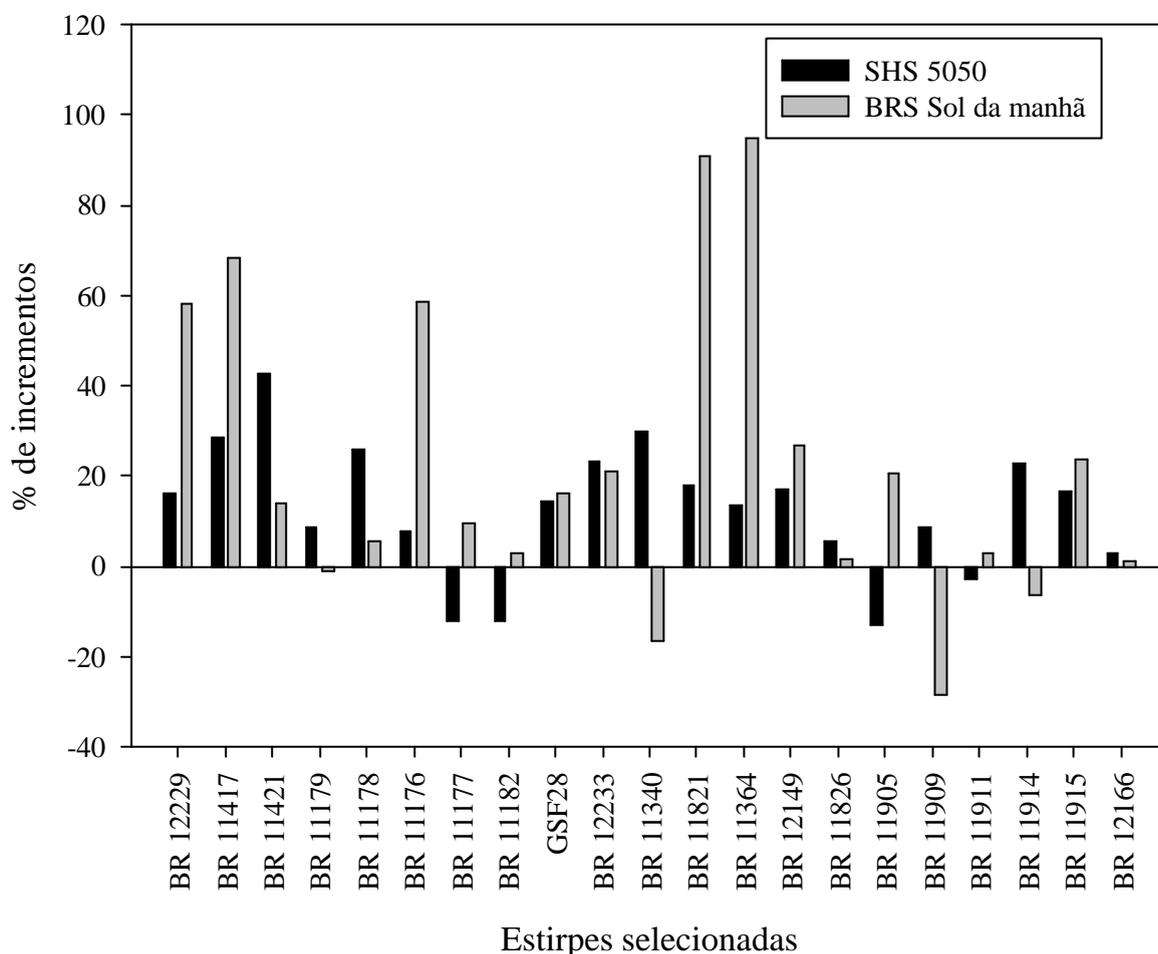
**Figura 6.** Médias de incrementos de biomassa seca dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N), na seleção em substrato esterilizado, em milho híbrido SHS 5050 e milho variedade BRS Sol da Manhã.

Outro motivo que pode explicar as diferentes respostas dos genótipos utilizados a inoculação dos isolados das espécies utilizadas é afinidade entre estirpes e cultivares (PATRIQUIN et al., 1983; WANI et al., 1990; OLIVARES et al., 1997; BASHAN & HOLGUIM, 1997) ou entre bactéria e espécie de plantas (BALDANI & DÖBEREINER,

1980; PENOT et al., 1992). Estes autores sugerem que as estirpes isoladas do interior das raízes (após a esterilização superficial) são muito mais eficientes e que se deve utilizar estirpes homólogas, isto é, isoladas do mesmo tipo de planta que se deseja inocular, especialmente quando a população nativa está presente (BODDEY & DÖBEREINER, 1988; WANI, 1990; FAVILLI et al., 1987; SUMNER, 1990).

Buscando avaliar o caráter homólogo, todos os isolados obtidos de plantas de milho, que contribuíram ou não na produção de massa seca nos experimentos em substrato esterilizado, foram testados em substrato não esterilizado.

Foram selecionados 21 isolados, sendo 10 de *Herbaspirillum* spp. e 11 isolados de *Burkholderia* spp., avaliados nos dois genótipos de milho (Figura 7). Admite-se que em substrato esterilizado não houve contribuição de outras bactérias, ou seja, estes isolados foram selecionados devido a sua contribuição individual.



**Figura 7.** Valores relativos de biomassa seca dos tratamentos inoculados selecionados sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N) em substrato esterilizado.

Este modelo de seleção se mostrou adequado, pois possibilitou a seleção de muitos isolados de bactéria em curto prazo.

## 4.2 Seleção de Estirpes em Substrato Não Esterilizado

Para esta etapa, dentre os 21 selecionados buscou-se o melhor isolado nos dois genótipos em condições de competição com outros microrganismos nativos, tendo em vista que nesta fase o substrato não foi esterilizado.

Os valores relativos de biomassa seca nesta fase variaram entre - 13,77 e 63,82 % superior a testemunha adubada e não inoculada (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores de biomassa seca (MSPA) e valores relativos das estirpes testadas em substrato não esterilizado.

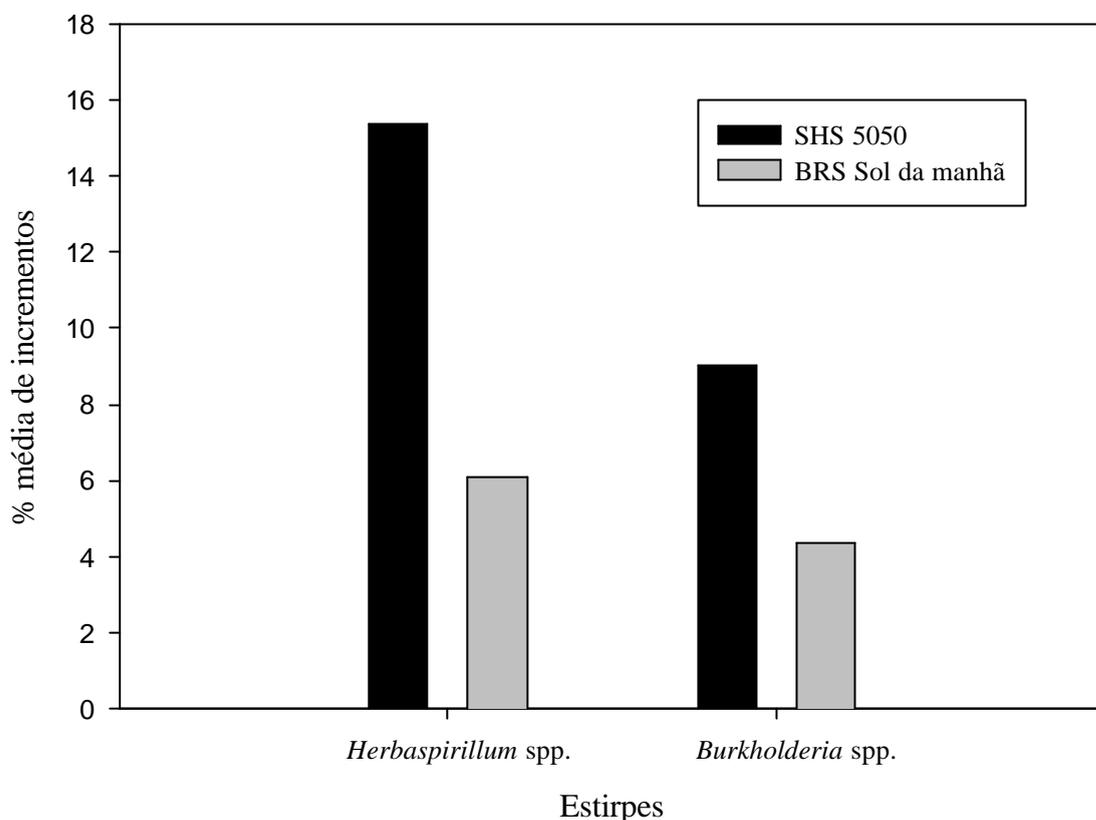
Estirpes	MSPA (g)	v.r.	MSPA (g)	% de inc
<i>Herbaspirillum</i> spp.	SHS 5050		BRS Sol da Manhã	
BR 11176	11,52 ± 1,18	-1,92	11,23 ± 1,26	0,67
BR 11177	12,78 ± 1,39	8,82	12,04 ± 1,37	7,98
BR 11178	12,49 ± 1,5	6,39	11,94 ± 0,82	7,09
BR 11179	11,68 ± 1,54	-0,55	10,83 ± 1,00	-2,91
BR 11182	12,48 ± 0,84	6,26	10,28 ± 2,18	-7,85
<b>BR 11417</b>	<b>9,96 ± 0,71 *</b>	<b>63,82</b>	<b>13,37 ± 2,44</b>	<b>43,56</b>
BR 11421	6,88 ± 1,48	13,16	10,72 ± 1,18	15,02
BR 12229	6,04 ± 0,57	-0,66	10,01 ± 2,51	7,40
BR 12233	8,12 ± 0,25 *	33,55	9,13 ± 3,85	-2,04
GSF28	7,60 ± 1,04 *	25,00	8,56 ± 3,87	-8,15
<i>Burkholderia</i> spp.				
BR 11340	6,96 ± 1,36	14,47	9,98 ± 3,14	7,08
BR 11364	5,72 ± 0,72	-5,92	8,97 ± 0,80	-3,76
BR 11821	7,76 ± 0,42 *	27,63	9,79 ± 4,30	5,15
BR 11826	7,6 ± 0,37 *	25,00	10,9 ± 3,83	17,06
BR 11905	12,25 ± 1,20	4,34	9,97 ± 1,20	-13,77
BR 11909	11,24 ± 0,34	-4,26	11,07 ± 1,63	-0,76
BR 11911	11,97 ± 1,76	1,92	11,34 ± 0,67	1,70
BR 11914	12,24 ± 0,85	4,26	11,08 ± 1,69	-0,67
BR 11915	13,93 ± 1,59	18,61	11,43 ± 0,82	2,47
BR 12149	6,88 ± 0,62	13,16	11,81 ± 2,19	26,72
BR 12166	6,80 ± 0,60	11,84	9,96 ± 4,05	6,87

MSPA- Matéria seca de parte aérea em gramas; v.r.- valor relativo sobre a testemunha não inoculada e adubada com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N; SHS 5050 – milho híbrido; BRS Sol da Manhã – milho variedade. As médias de MSPA seguidas com \* diferiram da testemunha não inoculada e adubada com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N à 5 % de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Dados originais em anexo. Médias e valores de MSPA de 3 experimentos.

Nesta etapa, assim como na anterior, não foi observado um melhor desempenho das estirpes isoladas de milho (BR 11176, 11177, 11178, 11179, 11182, 11905, 11909, 11911, 11914 e 11915 – Tabela 8), isto é, de estirpes homólogas, sugerindo não haver especificidade hospedeira. Isto pode ser uma vantagem, pois no futuro pode ser proposto um inoculante único para diversas culturas.

Nesta fase o híbrido SHS 5050 teve maiores incrementos de biomassa seca de parte aérea que a variedade BRS Sol da Manhã (Figura 8), esta, por sua vez, não respondeu a melhoria das condições atribuída ao substrato. Portanto, tem-se uma situação clara da

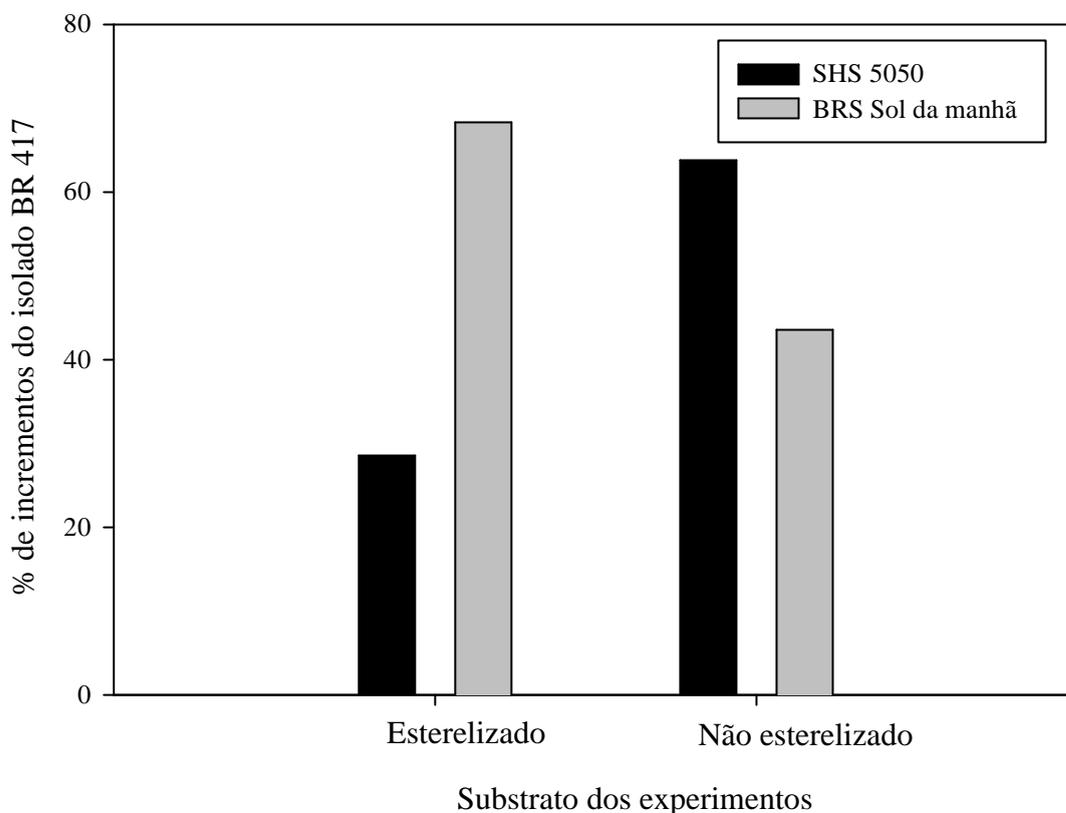
interação genótipo com ambiente havendo muita diferença entre os materiais, o que era desejado, pois um dos objetivos deste trabalho é selecionar uma estirpe para a cultura do milho e quanto mais distantes fossem as cultivares testadas, maior a abrangência de utilização da bactéria selecionada.



**Figura 8.** Médias de incrementos de biomassa seca dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. sobre a T20, na seleção em substrato não esterilizado, em milho híbrido SHS 5050 e milho variedade BRS Sol da Manhã.

Dentre os isolados testados, o isolado *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 (ZAE94) apresentou maior potencial para ser utilizado como inoculante para cultura do milho. Esta espécie tem sido alvo de inúmeros estudos, principalmente pela sua ocorrência em maior número de plantas estudadas.

Inúmeros experimentos já foram conduzidos para avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio de estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* em associação com cereais. Os resultados iniciais não mostraram efeitos positivos da inoculação em plantas de sorgo (PEREIRA et al., 1988) e milho (PEREIRA & BALDANI, 1995). No caso da cultura do arroz, a inoculação de estirpes de *H. seropedicae* promoveu aumento na produção de grãos equivalente a aplicação de 40 kg ha<sup>-1</sup> (PEREIRA & BALDANI, 1995). A inoculação com as estirpes Z67 e HRC54 de *H. seropedicae* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, mostraram incremento significativo no acúmulo de massa fresca de raízes e parte aérea aos 24 dias após a inoculação e massa fresca de parte aérea aos 64 dias após a inoculação (OLIVARES, 1997).



**Figura 9.** Incrementos de biomassa seca sobre a T20 (testemunha não inoculada e adubada com o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N) de dois genótipos de milho inoculados com a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 cultivados em substrato esterilizado e não esterilizado.

Em estudos mais recentes, foi observado que a FBN depende do genótipo da planta e sua interação com as diversas estirpes utilizadas (BALDANI et al., 2000; REIS et al., 2000). Quando estirpes de *Herbaspirillum* foram testadas em casa de vegetação e campo, pode-se observar a influência da variedade de arroz na resposta a inoculação com aumentos significativos de produção de grãos (GUIMARÃES, 2000). A inoculação com as estirpes Z67 e HRC54 de *H. seropedicae* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, mostrou incremento significativo no acúmulo de massa fresca de raízes e parte aérea aos 24 dias após a inoculação e massa fresca de parte aérea aos 64 dias após a inoculação (OLIVARES et al., 1997). A inoculação da estirpe HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5, em cana-de-açúcar estimulou a atividade da H<sup>+</sup> ATPase, provocou mudanças morfológicas radiculares e incremento de nutrientes na fase inicial do estabelecimento, e *H. seropedicae* contribuiu para o incremento da biomassa radicular, área foliar, conteúdo de clorofila e conteúdo de nutrientes (OLIVARES et al., 2002). RIGGS et al. (2001) mostrou incrementos significantes na produtividade de milho quando inoculado com *H. seropedicae* ZMS 152 e *Klebsiella pneumoniae* 342, devido a aumentar a nutrição mineral nitrogenada e promover o crescimento das plantas.

### 4.3 Teste de Estirpes em Condições de Campo

De modo geral, foi observada a superioridade dos híbridos de milho BR 1030 e SHS 5050 sobre as variedades BRS Sol da Manhã e BRS 106 na safrinha ou sobre a variedade BRS 106 na safra.

As análises estatísticas não evidenciaram efeitos significativos dos tratamentos de inoculação, somente de genótipos e de adubação, embora a inoculação tenha promovido aumentos de 24 a 34 % na produtividade em relação ao controle.

Diferenças significativas entre o número de plantas e o número de espigas não serão discutidos somente apresentados em anexo (Tabelas 24, 25, 27 e 28), pois foram analisados com intuito de controlar falhas ou justificar diferenças, caso fossem observadas.

Serão apresentados em detalhes apenas os resultados de produtividade de grãos, pois no teor de N não foram observadas diferenças estatísticas que justificassem seu detalhamento e estão no anexo (Tabelas 26 e 29) desta dissertação.

No experimento safrinha uma das repetições foi perdida, devido a incidência de capivaras na região, sendo analisado com cinco repetições.

#### 4.3.1. Produtividade de grãos na safrinha

No experimento na safrinha (Tabela 9) os híbridos tiveram produtividades superiores às variedades testadas, sendo o genótipo BR 1030 mais produtivo que o SHS 5050. Este, por sua vez, foi melhor que as variedades testadas, diferindo estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Esta superioridade dos híbridos era, de certa forma, esperada e foi verificada também em todos os níveis de adubação pelo teste de regressão, a 5 % de probabilidade. Neste fator adubação o modelo linear foi o que melhor se aplicou, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 99,45 %, o que indica que, na maior dose houve, em geral, a maior produtividade.

Como foi mencionado anteriormente, não houve diferença significativa entre os tratamentos de inoculação pelo teste de média Scott-Knott a 10 % de probabilidade. Entretanto, a 13 % foi verificada a interação dos fatores adubação nitrogenada e inoculação com o genótipo BR 1030, promovendo, em média, um incremento de 500 kg de grãos  $ha^{-1}$  quando inoculado. Na dose de 40 kg de N  $ha^{-1}$  (dose intermediária) a inoculação promoveu um aumento ainda maior, o que correspondeu a um incremento de 848 kg de grãos  $ha^{-1}$ , valor de produtividade não atingida nem quando aplicada a maior dose de N (80 kg de N  $ha^{-1}$ ) com inoculação ou não. Isto sugere que a combinação mais eficiente para este genótipo corresponde a inoculação com a dose intermediária de adubação nitrogenada.

O híbrido triplo SHS 5050 inoculado, quando adubado com a dose intermediária de N, atingiu produtividade equivalente ao controle quando adubado com o dobro de N. Isto sugere que a inoculação pode suprir até 40 kg  $ha^{-1}$  de N para atingir a mesma produtividade de grãos de milho. Resultados similares foram observados em arroz, onde tratamentos com as estirpes BR 11417 e BR 11340 proporcionaram resultados estatisticamente iguais ao tratamento adubado para a variedade IR42 (FERREIRA, 2004) e trigo, onde tratamentos inoculados com a estirpe JA04 de *Azospirillum brasilense* adubados com 15 kg de N  $ha^{-1}$  acumularam quantidade idêntica de N-total e produtividade de grãos estatisticamente igual ao tratamento com 60 kg de N  $ha^{-1}$  (DIDONET et al., 1996).

Já a variedade BRS 106, quando inoculada, apresentou incremento na maior dose de N de 24 % a mais que o controle não inoculado (616 kg de grãos  $ha^{-1}$  a mais). No entanto, o valor de produtividade desta combinação da inoculação com a maior dose de N foi bem próximo do controle adubado com 40 kg  $ha^{-1}$  de N. Isto pode ter ocorrido devido perdas de N

no solo, pois a adubação foi feita com uréia não incorporada, forma facilmente lixiviada e/ou volatilizada. Nas demais doses de N, a inoculação deste genótipo teve efeito negativo sobre a produtividade.

A inoculação da variedade BRS Sol da Manhã aumentou a produtividade em 354 kg de grãos ha<sup>-1</sup>, ou seja, 13 % de aumento em relação ao controle, somente na ausência da adubação nitrogenada. Portanto, para BRS Sol da Manhã, a viabilidade da inoculação só ocorre quando não se faz adubação nitrogenada. Este genótipo só foi testado neste experimento, devido a não disponibilidade de sementes.

#### **4.3.2. Produtividade de grãos na safra**

No experimento na safra (Tabela 10), o híbrido (SHS 5050) teve, novamente, produtividade superior à variedade testada (BRS 106) diferindo estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

O híbrido triplo SHS 5050, quando adubado com 40 kg ha<sup>-1</sup> atingiu novamente produtividade equivalente ao controle quando adubado com o dobro da dose, indicando ser esta a melhor combinação.

A inoculação da variedade BRS 106 promoveu incremento de 21 % (490 kg ha<sup>-1</sup> a mais) na maior dose de N, mas a produtividade obtida foi equivalente ao controle com a dose intermediária de N, indicando que houve efeito negativo da inoculação neste genótipo., da mesma forma vista no experimento safrinha.

Os resultados foram semelhantes aos obtidos no experimento safrinha o que aumenta sua confiabilidade. A inoculação da estirpe BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae* aumentou a produtividade de grãos em até 34 % em combinações diferenciadas de genótipo e adubação, indicando a existência da interação entre os fatores testados.

Estes incrementos apesar de não diferirem estatisticamente correspondem a ganhos de até 900 kg ha<sup>-1</sup>, sugerindo que existe aplicabilidade deste estudo para a agricultura.

Para a melhor utilização destes microrganismos na cultura do milho é necessário obter maiores conhecimentos da sua ecologia e dinâmica populacional, tendo em vista as condições físicas, químicas, e, principalmente, biológicas, do solo. Há necessidade, portanto, de estudos de ecologia, fisiologia e genética destes grupos de microrganismos, bem como de suas interações com as plantas, pois está bastante clara a influência destas bactérias nas plantas, sendo cada interação bastante específica. Torna-se, assim, imprescindível a busca de maior conhecimento para que as interações do milho com os microrganismos do solo possam ser melhor entendidas, e conseqüentemente, melhor manejadas.

**Tabela 9.** Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030, BRS Sol da Manhã e BRS 106 em experimento safrinha/2005, inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 ou não inoculados, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N). Médias de 5 repetições.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS Sol da Manhã			BRS 106			Médias
	Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	
0	3.526	3.115	-411	3.912	4.429	517	2.719	3.073	354	2.694	2.440	-254	3.239
40	3.604	3.748	144	3.993	4.841	848	2.935	2.973	38	3.341	2.403	-938	3.480
80	3.735	4.061	326	4.362	4.469	107	3.431	3.289	-142	2.533	3.149	616	3.629
<b>Médias</b>	3.622	3.641	19	4.089	4.580	491	3.028	3.112	84	2.856	2.664	-192	3.449
	3.632 b			4.334 a			3.070 c			2.760 c			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral.

**Tabela 10.** Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030 e BRS 106 em experimento safra 2005/2006, inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 ou não inoculados, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N). Médias de 6 repetições.

Trat.	SHS 5050			BRS 106			Médias
	Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	
0	3.168	2.996	-172	2.710	1.680	-1.030	2.981
40	2.659	3.562	903	2.768	2.498	-270	3.463
80	3.804	3.306	-498	2.358	2.848	490	3.370
<b>Médias</b>	3.210	3.288	78	2.612	2.342	-270	3.271
	3.249 a			2.477 b			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral.

#### 4.4 Quantificação da FBN

A avaliação da quantificação da FBN, apresentada nas tabelas 11 e 12, demonstra a capacidade dos genótipos de milho obterem N derivado da FBN para o seu desenvolvimento nos experimentos de safrinha e safra. Para estas avaliações foram utilizadas apenas as parcelas que não receberam adição de N mineral, buscando-se evitar efeitos de diluição isotópica do N do solo, através do uso de fertilizantes minerais nitrogenados.

Na safrinha, as plantas não inoculadas foram usadas como controle na determinação das contribuições de FBN. Para isto, admitiu-se que as contribuições da FBN nestas plantas através da associação com a microbiota diazotrófica nativa (não inoculada), ocorreu de forma uniforme para todos os tratamentos testados. Portanto, os valores apresentados referem-se ao ganho de FBN obtidos através do uso da inoculação com a estirpe selecionada de *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417, além da provável contribuição da FBN proveniente de espécies diazotróficas de ocorrência natural e, portanto, os valores observados estariam, no mínimo, subestimados.

Observou-se (Tabela 11) que nestas avaliações realizadas, a taxa de FBN no híbrido SHS 5050 inoculado foi significativamente superior à variedade BRS Sol da Manhã inoculada, com 45 % do N proveniente da FBN. Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, esta variedade, quando em substrato esterelizado, teve biomassa seca de parte aérea superior ao híbrido, mas em substrato não esterelizado foi inferior. Tais resultados sugerem que esta variedade tem uma adaptação às espécies nativas e por isso não foi observada contribuição.

**Tabela 11.** Valores médios de  $\delta^{15}\text{N}$  e FBN dos tratamentos de inoculação, estimados através da análise de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  de plantas de milho na safrinha.

Tratamentos	$\delta^{15}\text{N}$ não inoculada	$\delta^{15}\text{N}$ inoculada	FBN (%)
BRS Sol da Manhã	9,34 ± 1,26 b	9,32 ± 3,12 b	0
SHS 5050	12,56 ± 8,57 c	6,93 ± 1,13 a	44,86

Médias de 2 repetições, utilizando plantas não inoculadas como controle para a FBN. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Nas avaliações realizadas na safra, cada tratamento apresentou taxas de FBN calculada em função de três testemunhas. Observou-se (Tabela 12) que o valor médio de FBN no milho híbrido inoculado foi de 36 % de N proveniente de FBN, se equiparando ao encontrado no experimento safrinha, de 45 %, o que parece confirmar a melhor eficiência na transferência do N biologicamente fixado nas plantas deste genótipo, mesmo em condições climáticas distintas. Estes valores indicam que a eficiência da FBN associada com milho é aparentemente mais estável que na cultura de cana-de-açúcar, onde foram observadas variações de 0 a 70 % na contribuição da FBN em 48 lavouras comerciais no Brasil (POLIDORO, 2001).

Na variedade BRS 106, embora o valor de delta  $^{15}\text{N}$  no tratamento inoculado seja significativamente menor que o não inoculado, indicando uma maior contribuição da FBN, não se observou valores médios de FBN que certificassem tal indicação. Isto pode ser em decorrência da planta tiririca, usada como uma das testemunhas, ter apresentado baixos valores de delta, o que também foi verificado em POLIDORO (2001). Explicações para este fato ainda não foram encontradas até o momento, porém acredita-se que ocorre, entre outros

fatores, à contribuição da FBN nesta espécie, como o fenômeno da diminuição de  $^{15}\text{N}$  na parte aérea das plantas.

A tiririca, de nome científico *Cyperus rotundos* pertence à família Cyperaceae e produz pequenos tubérculos de alto poder germinativo, ricos em fitormônios. Segundo VOLZ (1977), as raízes de plantas do gênero *Cyperus* podem aumentar a atividade de bactérias desnitrificadoras, com conseqüente diminuição da disponibilidade de N o que pode estar favorecendo a FBN, justificando os resultados aqui verificados.

**Tabela 12.** Valores médios de  $d^{15}\text{N}$  e FBN dos tratamentos de inoculação e não inoculação, estimados através da análise de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  de plantas de milho e testemunhas na safra.

Tratamentos	$d^{15}\text{N}$ milho	$d^{15}\text{N}$ test.	FBN (%)
BRS 106 não inoculada		* $7,27 \pm 0,97$ a	0.00
	$7,34 \pm 1,07$ Ba	$9,63 \pm 0,81$ b	23.67
		$9,82 \pm 0,20$ b	25.25
Médias	-	$8,91 \pm 1,38$	$16,34 \pm 14,17$
BRS 106 inoculada		* $6,69 \pm 0,46$ b	11.91
	$5,90 \pm 1,49$ Aa	$7,56 \pm 0,54$ b	22.00
		$9,2 \pm 0,62$ c	35.92
Médias	-	$7,82 \pm 1,19$	$23,28 \pm 12,05$
SHS 5050 não inoculado		* $8,75 \pm 0,82$ b	17.75
	$7,19 \pm 0,98$ Ba	$9,19 \pm 0,68$ b	23.95
		$9,46 \pm 0,52$ b	21.69
Médias	-	$9,13 \pm 0,69$	$21,13 \pm 3,14$
SHS 5050 inoculado		* $8,63 \pm 0,83$ b	31.50
	$5,91 \pm 1,13$ Aa	$9,52 \pm 0,57$ b	37.87
		$9,57 \pm 0,75$ b	38.23
Médias	-	$9,23 \pm 0,79$	$35,87 \pm 3,79$

Médias de 4 repetições, utilizando testemunhas como controle para a FBN. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas comparam os valores de  $d^{15}\text{N}$  de plantas de milho entre os tratamentos e letras minúsculas comparam  $d^{15}\text{N}$  do milho com as testemunhas dentro de cada tratamento. \* - "tiririca" ou *Cyperus rotundus*.

Os resultados da análise de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  demonstram diferenças significativas na eficiência de FBN, entre os genótipos testados. Esta variação provavelmente é determinada pela interação planta-bactéria, discutida em diversas pesquisas, sendo um dos

pontos importantes para o maior aproveitamento da FBN em poáceas (REIS et al., 2006). Diversos autores (LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 1992; YONEYAMA et al., 1997; ASIS et al., 2002) documentaram diferenças em quantidades de nitrogênio fixado, entre os cultivares de cana, reafirmando a existência da interação planta-bactéria.

Os dois genótipos estudados foram desenvolvidos para ambientes de cultivo distintos, e possuem características contrastantes quanto à necessidade de adubação e algumas características agrônômicas. O híbrido SHS 5050 é muito utilizado quando se busca altas produtividades em condições ótimas de adubação e disponibilidade de água. As variedades BRS Sol da Manhã e a BRS 106 foram selecionadas para ter eficiência no uso do nitrogênio e por isso são recomendadas para locais com baixa fertilidade natural ou para produtores que utilizam pouco ou nenhum insumo em sua propriedade. Então, se esperava maior contribuição da FBN nas variedades, o que não foi verificado.

Uma diversidade de diazotróficos tem sido identificada em milho (BALDANI et al., 1980, 1986, 1996b; CHELIUS & TRIPLETT, 2000, 2001; PERIN et al., 2006) e descritas como rizobactérias promotoras de crescimento, mas não tem sido claramente documentada a contribuição da FBN para a cultura do milho (CHELIUS & TRIPLETT, 2000; GUTIÉRREZ-ZAMORA & MARTÍNEZ-ROMERO, 2001). Este também é o caso de outras não leguminosas associadas com bactérias diazotróficas (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; BISWAS et al. 2000a, b; JAMES, 2000; GILLER & MERCKX, 2003). Entretanto, a atividade de redução de acetileno e incorporação de N em milho tem sido reportada (BÜLOW & DÖBEREINER, 1975; RENNIE, 1980; ALEXANDER & ZUBERER, 1989; RIBAUDO et al., 2006). GARCÍA DE SALAMONE et al. (1996) verificaram através da técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  que a inoculação com *Azospirillum* spp. contribuiu com significantes níveis de FBN dependendo do genótipo de milho.

Os genótipos BRS 106 e SHS 5050, avaliados na safra apresentaram taxas de FBN em torno de 44 e 67 % superiores quando inoculados com a bactéria *H. seropedicae*.

Desta forma, o híbrido SHS 5050 inoculado com a estirpe BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae* em condições de campo apresentou uma maior capacidade de obter contribuições para sua nutrição nitrogenada através da FBN que as variedades, inoculadas com a mesma estirpe, o que ficou confirmado nos dois experimentos realizados em épocas diferentes.

## 5 CONCLUSÕES

A estirpe BR 11417 (ZAE94) de *Herbaspirillum seropedicae* apresenta maior potencial como insumo biológico para a cultura do milho em experimentos conduzidos em casa de vegetação.

Na safrinha a inoculação da estirpe de *H. seropedicae* BR 11417, aplicado no híbrido BR 1030, é suficiente para manter a produtividade da cultura.

Pela técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , o híbrido SHS 5050 recebe contribuição de 45 e 36 % de N provenientes da FBN nos experimentos de safrinha e safra.

No experimento safra a inoculação com a estirpe BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae* aumenta a contribuição de N proveniente da FBN em 44 e 67 % na variedade BRS 106 e no híbrido SHS 5050.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A.  $^{15}\text{N}_2$  fixation by bacteria associated with maize roots at a low partial  $\text{O}_2$  pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1748-1753, 1989.
- ASIS, C. A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; OHWAKI, Y.; YONEYAMA, T.; TSUCHIYA, K.; HAYASHI, N.; NAKANISHI, Y.; AKAO, S. Estimation of the nitrogen fixation by sugarcane cultivar NiF-8 using  $^{15}\text{N}$  dilution and natural  $^{15}\text{N}$  abundance techniques. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 48, p. 283–285, 2002.
- BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S. de; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996a.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J. I.; KIRCHOFF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliense* sp. XXX uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 69, p. 116-166, 1996b.

- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 6, p. 627-639, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BEADLE, G. W. Teosinte and the origin of maize. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 30, p. 245-247, 1939.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M. V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacea*. **Microbiology**, New York, v. 140, p. 1069-1077, 1994.
- BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000a.
- BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G.; ROLFE, B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000b.
- BLECKER, H. C.; LÉON, J. Stability analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, Berlin, v. 101, n. 1, p. 1-23, 1988.
- BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA / SBCS / SBM, 1998. p. 809. FERTBIO 98.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 53-65, 1988.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 889-895, 2001.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBRUD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 1989-1999, 1998.
- BRASIL, M. da S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005, 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and biological properties**. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, 1982. Part 2. p. 595-624.

BÜLOW, C. F. W. von; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 72, p. 2389-2393, 1975.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.

CARDOSO, M. J.; CARVALHO, H. W. L. de; LEAL, M. de L. da S.; SANTOS, M. X. dos; OLIVEIRA, A. C. Desempenho de cultivares de milho na região meio-norte do Brasil. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 15, n. 1, p. 53-60, 2003.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; FARIA, S. M. de; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 169-175, 2003.

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

DA RÓZ, A.L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 4-6, 2003.

DE-POLLI, H. (Coord.). **Manual de adubação para o Estado do Rio de Janeiro**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1988. 179 p. (Coleção Universidade Rural. Ciências Agrárias, n. 2).

DIDONET, A. G.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 9, p. 645-651, 1996.

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

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-179.

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

DOEBLEY, J. Molecular evidence and the evolution of maize. **Economic Botany**, Bronx, v. 44, p. 6-27, 1990.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 37-59, 2004.

DUARTE, A. P. Característica e sistemas de produção. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 109-139.

DUARTE, J. O. **Introdução e importância econômica do milho** - 2002. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/milho/cultivodomilho/importancia.htm>. Acesso em: 04 nov. 2006.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa Saeg (Sistema para análises estatísticas e genéticas)**. Viçosa: UFV, 1983. 59 p.

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

FALLIK, J.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 511-515, 1996.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FAVILLI, F.; BALLONI, W.; CAPPELLINI, A.; GRANCHI, L.; SAVOINI, G. Esperienze pluriennali di batterizzazione in campo com *Azospirillum* spp. di colture cerealicole. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 169-181, 1987.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 210.

FERREIRA, D. F. **Sisvar, Versão 4.6. 2003 DEX/UFLA. 2003**. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>>. Acesso em: 3 Jan. 2005.

FERREIRA, J. S. **Seleção e avaliação de veículo para a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura de arroz inundado**. 2004. 44 f Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 117-128, 1999.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E. G.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 23, p. 249-256, 1996.

GILLER, K. E.; MERCKX, R. Exploring the boundaries of N<sub>2</sub>-fixation in cereals and grasses: an hypothetical and experimental framework. **Symbiosis**, Rehovot, v. 35, p. 3-17, 2003.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 292-294. (Developments in Plant and Soil Sciences, v. 48).

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 45, p. 274-289, 1995.

GOMES, L. S. **Interação genótipos x épocas de plantio em milho (*Zea mays*, L.) em dois locais do oeste do Paraná**. 1990. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

GORIS, J.; VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J. M.; VANDEMME, P. Classification of the PCB-and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1677-1681, 2004.

GUIMARÃES, S. L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em arroz inundado**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Influência da inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas na produção de grãos de arroz inundado crescido sob condições de campo. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 1., REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 7., 2002, Florianópolis, SC. **Anais...** Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 561-564. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 134). RENAPA.

GUIMARÃES, S. L.; SILVA, R. A.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Effects of the inoculation of endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of two rice varieties (guarani and CNA 8305) grown under field conditions. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 431. (Current Plant Sciences and Biotechnology in Agriculture, 38).

GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) L. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 91, p. 117-126, 2001.

HOEFT, R. G. Fertilizer nitrogen: providing food and protecting the environment. **Better Crops with Plants Food**, Atlanta, v. 74, p. 4-8, 1990.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS (GCEA/IBGE, DPE, COAGRO). **Levantamento sistemático da Produção Agrícola – outubro de 2005**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2006.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 65-79, 1997.

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

LEMOS, M. A **Variabilidade fenotípica em híbridos simples, híbridos duplos, variedades e compostos de milho**. 1976. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

LEMOS, R. C.; SANTOS, R. D. dos. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 2. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. 84 p.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a <sup>15</sup>N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 165–170, 1987.

MACNEISH, R. S.; EUBANKS, M. E. Comparative analysis of the Rio Balsas and Tehuacán models for the origins of maize. **Latin American Antiquity**, Washington, v. 11, p. 3-20, 2000.

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

MUNIZ, J. A. **Avaliação da estabilidade de cultivares de milho em diferentes níveis de adubação e locais da região de Lavras, MG**. 1995. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NASPOLINI FILHO, V. **Variabilidade fenotípica e estabilidade em híbridos simples, híbridos duplos, variedades e compostos de milho**. 1976. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

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

OKON, Y.; ALBRECHT, S. L.; BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum liporerum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 27, p. 1248-1254, 1976.

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

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp. híbrido*) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 353 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C.; NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 9th., 2002, Leuven, Belgium. **Book of abstracts...** Leuven: Katholieke Universiteit / Centre of Microbial and Plant Genetics, 2002. p. 38-39.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.

PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.; CABALLERO-MELLADO, J. Respuesta del maiz a la inoculacion com *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v. 30, p. 351-355, 1988.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 900-915, 1983.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUINGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38. p. 798-803, 1992.

PEREIRA, J. A. R.; BALDANI, J. I. Selection of *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - THE ROLE BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 220-221.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTI, V. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 110, p. 269-274, 1988.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1931-1937, 2006.

PERIN, L.; SILVA, M. F. da; FERREIRA, J. F.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, Seropédica, RJ, v. 37, p. 47-53, 2003.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 2101-2103, 2001.

POLIDORO, J. C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica de nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar**. 2001. 185 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-404, 1994.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RENNIE, R. J. <sup>15</sup>N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 58, p. 21-24, 1980.

RIBAUDO, C. M.; RONDANINI, D. P.; TRINCHERO, G. D.; CURÁ, J. A. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, Italy, v. 51, p. 481-485, 2006.

RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de milho em diferentes condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 2213-2222, 2000.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 829-836, 2001.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R. V. A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *Citri* Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1986.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1341-1348, 2006.

SCHLOTTER, M.; BODE, W.; HARTMANN, A.; BEESE, F. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 399-403, 1992.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 13, p. 699-756, 1986.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Oxford, v. 30, p. 507-512, 1974.

SOUZA, M. P.; BRAGA, J. M. Aspectos econômicos da produção e comercialização do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 109-139.

STRALIOTTO, R. **Protocolo operacional para o preparo da turfa para produção de inoculante rizobiano**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, 2000. 4p.

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

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

TSUNECHIRO, A.; DUARTE, A. P.; OKAWA, H. Custo operacional da cultura de milho, por região e época, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 53-60, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

USDA Official Estimates world corn production, consumption and stocks. Created in 1/1/2006. Disponível em: <[http://www.faz.usda.gov/psd/complete\\_tables/GF-table9-81.htm](http://www.faz.usda.gov/psd/complete_tables/GF-table9-81.htm)>. Acesso em: 15 maio 2006.

- VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, DE P. E WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, p. 507-512, 2002.
- VOLZ, M. G. Infestations of yellow nutsedge in cropped soil: effects on soil nitrogen availability to the crop and associated N transforming bacterial populations. **Agroecosystem**, Dordrecht, v. 3, p. 313-319, 1977.
- WANI, P. Inoculation with associative nitrogen-fixing bacteria: role in cereal grain production improvement. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 30, p. 363-393, 1990.
- WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 11, p. 2277-2285, 2000.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, p. 239-244, 1997.
- ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururienses* sp. nov., a trichloroethylene (TCE) – degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 743-749, 2000.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Meios de Crescimento Utilizados – Composição por Litro:

#### Solução e micronutrientes para meio de cultura

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,200g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,235g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,280g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,008g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,024g

Completar o volume para 200 mL com água destilada.

#### Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada e manter a solução em geladeira.

#### JMV

Manitol		5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	sol. 10 %	6 mL
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	sol. 10 %	18 mL
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10 %	1 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		100 mg

Completar para 1 L com água destilada.

Ajustar o pH para 4,2-5,4.

Adicionar 25 g de agar.

## JNFb

Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 mL
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10 %	1 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		20 mg
Completar para 1 L com água destilada.		
Ajustar o pH para 5,8.		
Adicionar 15 g de agar.		

## DYG'S

Glicose		2,0 g
Ácido málico		2,0 g
Peptona bacteriológica		1,5 g
Extrato de levedura		2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,5 g
Ácido glutâmico		1,5 g
Água destilada		1000 mL
pH 6,0 para <i>Herbaspirillum</i> .		
pH 5,5 para <i>Burkholderia</i>		

## 7.2 Médias dos Experimentos

### 7.2.1 Tabelas com as médias de todas as variáveis avaliadas nos experimentos em substrato esterilizado em casa de vegetação

**Tabela 13.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 1).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11364	1,59 b	13,57	0,65 a	142,34 b	31,27 b	0,83 a
BR 11826	1,45 b	3,57	0,69 a	181,89 a	35,48 b	0,90 a
BR 12166	1,44 b	2,86	0,55 a	157,01 b	32,83 b	0,88 a
BR 11365	1,40 b	0,00	0,68 a	152,89 b	35,49 b	0,77 a
BR 12164	1,37 b	-2,14	0,61 a	219,33 a	48,36 a	0,82 a
BR 11363	1,36 b	-2,86	0,63 a	186,05 a	32,60 b	0,80 a
BR 11366	1,30 b	-7,14	0,62 a	238,49 a	50,50 a	0,79 a
BR 12165	1,22 b	-12,86	0,59 a	208,93 a	40,71 a	0,83 a
T0	0,31 c	-77,86	0,24 b	87,65 b	19,30 b	0,80 a
T20	1,40 b	0,00	0,58 a	192,56 a	42,33 a	0,80 a
T40	2,90 a	107,14	0,79 a	268,70 a	61,43 a	1,08 a
CV	48,46	-	35,81	39,60	36,86	15,16

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 14.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 2).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11417	2,92 b	25,86	0,96 b	206,78 a	43,19 a	0,60 a
BR 11198	2,84 b	22,41	1,04 b	269,53 a	44,70 a	0,62 a
BR 12229	2,69 b	15,95	1,50 a	285,20 a	45,09 a	0,63 a
GSF28	2,65 b	14,22	0,93 b	236,47 a	37,09 a	0,58 a
BR 12232	2,51 b	8,19	1,04 b	245,23 a	44,40 a	0,62 a
BR 11510	2,50 b	7,76	1,27 a	252,38 a	57,77 a	0,62 a
GSF30 <sup>T</sup>	2,47 b	6,47	1,33 a	230,19 a	47,37 a	0,63 a
BR 11194	2,45 b	5,60	0,89 b	228,56 a	47,49 a	0,63 a
BR 11191	2,37 b	2,16	0,83 b	229,32 a	41,08 a	0,58 a
BR 11335	2,37 b	2,16	0,94 b	223,09 a	42,38 a	0,61 a
P74	2,32 b	0,00	1,35a	248,36 a	54,41 a	0,58 a
T0	0,51 c	-78,02	0,69 b	132,72 a	27,42 a	0,54 a
T20	2,32 b	0,00	1,70 a	237,04 a	48,78 a	0,68 a
T40	3,65 a	57,33	1,89 a	309,68 a	61,38 a	0,72 a
CV	28,20	-	47,99	29,24	36,12	7,03

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 15.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 3).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11340	2,80 a	29,63	0,75 a	295,67 a	43,30 a	0,61 b
BR 11821	2,55 a	18,06	0,68 b	265,28 a	38,23 a	0,65 a
BR 12149	2,53 a	17,13	0,73 a	271,69 a	40,74 a	0,60 b
KP23 <sup>T</sup>	2,34 b	8,33	0,64 b	249,94 a	38,77 a	0,66 a
BR 12234	2,16 b	0,00	0,66 b	261,39 a	40,66 a	0,63 b
BR 11816	2,06 b	-4,63	0,56 b	249,94 a	39,54 a	0,68 a
TVV75 <sup>T</sup>	1,96 b	-9,26	0,58 b	240,71 a	35,30 a	0,60 b
BR 11822	1,78 b	-17,59	0,57 b	232,28 a	33,59 a	0,66 a
BR 11815	1,77 b	-18,06	0,54 b	242,77 a	36,43 a	0,63 b
BR 11807	1,56 b	-27,78	0,47 c	214,43 a	31,14 a	0,59 b
T0	0,44 c	-79,63	0,23 d	102,05 b	17,65 a	0,77 a
T20	2,16 b	0,00	0,62 b	252,36 a	37,04 a	0,74 a
T40	2,98 a	37,96	0,90 a	308,55 a	46,39 a	0,68 a
CV	30,84	-	29,43	24,07	26,52	9,03

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 16.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 4).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11421	1,98 a	-10,00	0,61 a	222,34 a	30,66 b	0,98 a
BR 12233	1,71 b	-22,27	0,52 a	252,95 a	30,66 b	0,88 b
BR 11175	1,68 b	-23,64	0,47 b	227,59 a	32,17 b	0,84 b
BR 11765	1,68 b	-23,64	0,53 a	303,53 a	49,76 a	0,99 a
BR 12230	1,65 b	-25,00	0,61 a	232,26 a	31,56 b	0,85 b
BR 11818	1,57 b	-28,64	0,58 a	248,38 a	36,35 b	0,88 b
BR 11504	1,60 b	-27,27	0,75 a	250,70 a	31,66 b	0,90 b
BR 11192	1,32 b	-40,00	0,68 a	235,32 a	32,54 b	1,00 a
BR 11181	1,25 b	-43,18	0,63 a	201,67 a	26,09 b	0,92 b
T0	1,39 b	-36,82	0,62 a	84,55 b	11,54 c	0,81 b
T20	2,20 a	0,00	0,55 a	236,35 a	35,40 b	1,03 a
T40	2,65 a	20,45	0,58 a	253,63 a	32,42 b	0,83 b
cv	42,75	-	29,96	21,28	27,14	11,93

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 17.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo BRS Sol da Manhã de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 6).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11340	1,63 b	-16,41	0,67 b	184,32 b	22,00 b	0,89 c
BR 11821	3,72 a	90,77	1,08 a	275,96 a	29,84 a	0,72 d
BR 12149	2,47 b	26,67	0,81 b	198,56 b	23,62 b	1,02 c
BR 11364	3,81 a	95,38	1,37 a	252,59 a	28,68 a	1,08 b
BR 11826	1,98 b	1,54	0,69 b	177,42 b	21,17 b	1,16 b
BR 12166	1,97 b	1,03	0,72 b	212,02 a	23,97 b	1,21 b
KP23 <sup>T</sup>	2,32 b	18,97	0,69 b	202,17 b	25,03 a	1,05 c
BR 11366	2,23 b	14,36	0,78 b	214,90 a	27,26 a	0,95 c
TVV75 <sup>T</sup>	1,91 b	-2,05	0,69 b	191,18 b	20,59 b	1,16 b
BR 11345	3,21 a	64,62	0,72 b	170,68 b	19,42 b	1,12 b
BR 11417	3,27 a	67,69	1,22 a	233,32 a	26,89 a	1,06 c
BR 11198	1,77 b	-9,23	0,56 b	181,81 b	20,19 b	1,26 b
BR 12229	3,08 a	57,95	0,89 b	222,62 a	25,37 a	1,10 b
BR 11421	2,22 b	13,85	0,67 b	192,91 b	25,58 a	1,16 b
BR 11181	2,55 b	30,77	0,96 a	231,97 a	27,15 a	0,92 c
BR 12233	2,36 b	21,03	0,89 b	209,26 a	25,83 a	1,03 c
BR 11175	2,33 b	19,49	0,88 b	208,10 a	22,12 b	0,90 b
BR 11765	2,24 b	14,87	0,68 b	187,07 b	19,68 b	1,17 a
GSF28	2,26 b	15,90	0,64 b	213,20 a	26,65 a	1,11 b
BR 12230	2,40 b	23,08	0,84 b	215,12 a	25,05 a	1,13 b
T0	2,36 b	21,03	0,91 b	243,20 a	29,44 a	0,97 c
T20	1,95 b	0,00	1,16 a	238,95 a	27,65 a	0,99 c
T40	4,05 a	107,69	1,04 a	223,60 a	23,15 b	1,54 a
CV	33.64	-	30.47	16.74	16.65	16.91

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 18.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 9, híbrido).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR
BR 11345	0,78 b	11,43	0,39 a	190,12 b	27,44 a
BR 11905	0,61 c	-12,86	0,34 b	199,32 b	26,16 b
BR 11914	0,86 b	22,86	0,39 a	222,47 a	28,85 a
BR 11911	0,68 c	-2,86	0,35 b	188,89 b	21,72 b
BR 11915	0,82 b	17,14	0,38 a	199,16 b	30,19 a
BR 11909	0,76 b	8,57	0,37 a	228,53 a	28,63 a
BR 11182	0,62 c	-11,43	0,30 b	164,70 b	22,86 b
BR 11179	0,76 b	8,57	0,31 b	171,02 b	21,94 b
BR 11178	0,88 b	25,71	0,42 a	244,28 a	30,66 a
BR 11177	0,62 c	-11,43	0,31 b	178,25 b	25,05 b
BR 11176	0,76 b	8,57	0,37 a	180,67 b	22,30 b
T0	0,36 d	-48,57	0,28 b	132,50 b	21,96 b
T20	0,70 c	0,00	0,32 b	180,78 b	25,53 b
T40	1,11 a	58,57	0,45 a	274,39 a2	35,61 a
CV	17.97	-	18.37	18.77	21.04

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 19.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo BRS Sol da Manhã de milho cultivado em substrato esterilizado (experimento 9, variedade).

<b>Tratamentos</b>	<b>MSPA</b>	<b>INCR</b>	<b>MSR</b>	<b>AR</b>	<b>CR</b>
BR 11905	0,65 c	16,07	0,32 c	312,07 b	50,91 b
BR 11914	0,50 c	-10,71	0,23 c	155,94 d	24,52 c
BR 11911	0,55 c	-1,79	0,29 c	289,18 c	50,21 b
BR 11915	0,66 c	17,86	0,27 c	208,56 d	35,87 c
BR 11909	0,38 d	-32,14	0,25 c	209,06 d	34,28 c
BR 11182	0,55 c	-1,79	0,24 c	164,38 d	27,89 c
BR 11179	0,53 c	-5,36	0,26 c	135,17 d	25,68 c
BR 11178	0,56 c	0,00	0,27 c	160,28 d	26,47 c
BR 11177	0,58 c	3,57	0,26 c	181,58 d	25,28 c
BR 11176	0,84 a	50,00	0,45 a	549,06 a	90,25 a
BR 11363	0,84 a	50,00	0,45 a	264,38 c	39,96 c
BR 11365	0,71 b	26,79	0,27 c	350,48 b	58,54 b
BR 12164	0,73 b	30,36	0,29 c	277,24 c	44,33 c
BR 12165	0,37 d	-33,93	0,18 c	182,46 d	29,85 c
BR 12234	0,59 c	5,36	0,22 c	173,25 d	27,93 c
BR 11807	0,22 d	-60,71	0,12 c	190,52 d	39,01 c
BR 11815	0,40 d	-28,57	0,23 c	333,23 b	56,89 b
BR 11816	0,59 c	5,36	0,37 b	354,97 b	60,10 b
BR 11818	0,60 c	7,14	0,24 c	262,47 c	41,86 c
BR 11822	0,56 c	0,00	0,30 c	277,93 c	42,90 c
BR 11510	0,47 c	-16,07	0,27 c	261,63 c	36,91 c
BR 11504	0,84 a	50,00	0,36 b	276,14 c	38,37 c
GSF30 <sup>T</sup>	0,54 c	-3,57	0,31 c	206,25 d	31,19 c
BR 11335	0,53 c	-5,36	0,24 c	249,35 c	38,630 c
BR 11191	0,58 c	3,57	0,28 c	196,13 d	28,97 c
BR 11192	0,61 c	8,93	0,34 b	202,88 d	32,71 c
BR 11194	0,54 c	-3,57	0,30 c	201,72 d	33,46 c
P74	0,91 a	62,50	0,42 a	392,70 b	68,12 b
BR 12232	0,65 c	16,07	0,26 c	211,27 d	31,31 c
T0	0,31 d	-44,64	0,23 c	176,47 d	28,90 c
T20	0,56 c	0,00	0,24 c	165,33 d	31,94 c
T40	0,99 a	76,79	0,35 b	235,53 c	35,09 c
<b>CV</b>	<b>19,44</b>	<b>-</b>	<b>25,21</b>	<b>28,94</b>	<b>33,48</b>

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

## 7.2.2 Tabelas com as médias de todas as variáveis avaliadas nos experimentos em substrato não esterilizado em casa de vegetação

**Tabela 20.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato não esterilizado (experimento 5).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11421	6,88 c	13,16	2,28 a	348,39 a	36,61 a	2,70 a
GSF28	7,60 b	25,00	3,33 a	413,18 a	41,98 a	2,70 a
BR 11417	9,96 a	63,82	3,42 a	428,12 a	48,71 a	2,42 a
BR 12229	6,04 c	-0,66	2,65 a	363,45 a	40,15 a	2,50 a
BR 12233	8,12 b	33,55	3,03 a	396,63 a	42,94 a	2,65 a
BR 11340	6,96 c	14,47	2,57 a	378,80 a	40,82 a	2,73 a
BR 11826	7,60 b	25,00	3,23 a	457,60 a	51,24 a	2,60 a
BR 11364	5,72 c	-5,92	2,32 a	335,19 a	34,65 a	2,61 a
BR 11821	7,76 b	27,63	3,03 a	426,03 a	48,76 a	2,84 a
BR 12149	6,88 c	13,16	2,64 a	280,90 a	29,41 a	2,53 a
BR 12166	6,80 c	11,84	3,36 a	414,07 a	49,98 a	2,71 a
T0	5,56 c	-8,55	2,62 a	332,11 a	39,01 a	2,44 a
T20	6,08 c	0,00	2,60 a	343,80 a	39,24 a	2,47 a
T40	7,92 b	30,26	2,30 a	264,75 a	26,69 a	2,71 a
CV	13,02	-	25,34	24,09	25,96	21,44

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 21.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo BRS Sol da Manhã de milho cultivado em substrato não esterilizado (experimento 7).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11340	9,98 a	7,08	4,07 a	210,65 b	21,81 b	1,93 a
BR 11821	9,80 a	5,15	4,03 a	191,31 b	18,54 b	1,97 a
BR 12149	11,81 a	26,72	4,23 a	228,08 a	23,25 b	1,79 a
BR 11364	8,97 a	-3,76	3,95 a	188,99 b	19,95 b	1,83 a
BR 11826	10,91 a	17,06	4,21 a	229,45 a	22,17 b	1,97 a
BR 12166	9,96 a	6,87	4,34 a	249,65 a	28,52 a	1,97 a
KP23 <sup>T</sup>	9,66 a	3,65	4,86 a	214,70 b	21,53 b	2,09 a
BR 11366	12,21 a	31,01	4,84 a	258,55 a	28,04 a	1,75 a
TVV75 <sup>T</sup>	10,52 a	12,88	4,45 a	246,15 a	25,92 a	1,96 a
BR 11345	9,35 a	0,32	4,70 a	252,50 a	28,48 a	1,79 a
BR 11417	13,38 a	43,56	4,89 a	260,29 a	28,75 a	1,50 a
BR 11198	10,69 a	14,70	4,68 a	206,70 b	21,20 b	2,06 a
BR 12229	10,02 a	7,51	3,83 a	203,37 b	22,96 b	1,95 a
BR 11421	10,72 a	15,02	4,64 a	232,34 a	21,71 b	1,80 a
BR 11181	9,69 a	3,97	4,48 a	222,68 a	24,80 a	1,93 a
BR 12233	9,13 a	-2,04	3,47 a	163,91 b	16,64 b	1,94 a
BR 11175	10,87 a	16,63	4,67 a	231,47 a	25,78 a	1,65 a
BR 11765	11,39 a	22,21	4,78 a	244,27 a	26,53 a	1,72 a
GSF28	8,56 a	-8,15	3,49 a	172,84 b	18,14 b	2,41 a
BR 12230	11,26 a	20,82	5,97 a	281,28 a	31,18 a	1,45 a
T0	7,28 a	-21,89	3,41 a	184,29 b	19,42 b	1,90 a
T20	9,32 a	0,00	3,98 a	206,51 b	21,19 b	2,20 a
T40	11,73 a	25,86	5,21 a	281,40 a	28,85 a	2,81 a
CV	33,05	-	26,2	22,18	29,71	24,84

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 22.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo SHS 5050 de milho cultivado em substrato não esterilizado (experimento 8, híbrido).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11905	24,50 a	4,34	8,66 a	273,83 a	34,45 a	1,12 a
BR 11914	24,48 a	4,26	8,50 a	241,94 a	31,03 a	1,17 a
BR 11911	23,93 a	1,92	6,95 a	216,52 a	29,78 a	1,40 a
BR 11915	27,85 a	18,61	8,53 a	273,65 a	33,12 a	1,16 a
BR 11909	22,48 a	-4,26	7,86 a	248,06 a	33,77 a	1,23 a
BR 11182	24,95 a	6,26	8,58 a	250,83 a	34,00 a	1,18 a
BR 11179	23,35 a	-0,55	7,36 a	233,58 a	35,62 a	1,24 a
BR 11178	24,98 a	6,39	9,01 a	274,63 a	36,19 a	1,29 a
BR 11177	25,55 a	8,82	7,89 a	222,38 a	26,86 a	1,28 a
BR 11176	23,03 a	-1,92	8,07 a	232,24 a	29,93 a	1,25 a
T0	22,48 a	-4,26	7,41 a	231,15 a	31,45 a	1,24 a
T20	23,48 a	0,00	8,59 a	270,34 a	35,35 a	1,00 a
T40	23,43 a	-0,21	7,23 a	232,16 a	29,94 a	1,19 a
CV	10,89	-	15,72	16,14	20,26	18,22

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR= % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

**Tabela 23.** Produção de biomassa seca, desenvolvimento radicular e teor de nitrogênio no genótipo BRS Sol da Manhã de milho cultivado em substrato não esterilizado (experimento 8, variedade).

Tratamentos	MSPA	INCR	MSR	AR	CR	N %
BR 11905	19,23 a	-13,77	7,64 a	272,25 a	33,79 a	1,24 a
BR 11914	22,15 a	-0,67	7,86 a	258,78 a	33,98 a	1,18 a
BR 11911	22,68 a	1,70	6,72 a	245,25 a	34,69 a	1,60 a
BR 11915	22,85 a	2,47	8,39 a	305,45 a	37,27 a	1,15 a
BR 11909	22,13 a	-0,76	7,69 a	256,83 a	35,43 a	1,16 a
BR 11182	20,55 a	-7,85	6,17 a	220,40 a	27,38 a	1,32 a
BR 11179	21,65 a	-2,91	7,80 a	317,53 a	45,24 a	1,11 a
BR 11178	23,88 a	7,09	8,70 a	295,21 a	37,30 a	1,60 a
BR 11177	24,08 a	7,98	7,62 a	239,21 a	31,62 a	1,38 a
BR 11176	22,45 a	0,67	7,33 a	251,36 a	35,09 a	1,24 a
T0	19,98 a	-10,40	5,78 a	200,47 a	25,77 a	1,49 a
T20	22,30 a	0,00	8,69 a	278,66 a	38,40 a	1,21 a
T40	24,08 a	7,98	7,99 a	278,63 a	37,82 a	1,25 a
CV	13,58	-	22,45	19,32	22,09	29,37

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. MSPA= matéria seca de parte aérea (g); INCR = % de incremento de MSPA em relação à testemunha nitrogenada com 20 kg.ha<sup>-1</sup>; MSR= matéria seca de raiz (g); AR= Área Radicular (cm<sup>2</sup>); CR= Comprimento Radicular (m); N %; CV - coeficiente de variação (%).

### 7.2.3 Tabelas com as médias de todas as variáveis avaliadas nos experimentos em condições de campo

#### 7.2.3.1 Safrinha 2005

**Tabela 24.** Número de plantas de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030, BRS Sol da Manhã e BRS 106 em experimento safrinha/2005, inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 ou não inoculados, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS Sol da Manhã			BRS 106			Médias
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	
0	37	39	2	45	45	0	47	46	-1	37	41	4	42
40	43	41	-2	47	49	2	44	44	0	42	38	-4	44
80	42	40	-2	45	48	3	44	48	4	39	44	5	44
Médias	41	40	-1	46	47	1	45	46	1	39	41	2	43
	41			47			46			40			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 5 repetições

**Tabela 25.** Número de espigas de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030, BRS Sol da Manhã e BRS 106 em experimento safrinha/2005, inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 ou não inoculados, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS Sol da Manhã			BRS 106			Médias
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	
0	40	35	-5	42	44	2	42	45	3	46	48	2	43
40	45	42	-3	48	50	2	44	44	0	47	48	1	46
80	43	42	-1	44	47	3	45	49	4	48	51	3	46
Médias	43	40	-3	45	47	2	44	46	2	47	49	2	45
	42			46			45			48			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 5 repetições

**Tabela 26.** Percentual de N (%) nos grãos de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030, BRS Sol da Manhã e BRS 106 na safrinha, inoculados ou não com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS Sol da Manhã			BRS 106			
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	Médias
0	1,56	1,44	-0,12	1,73	1,66	-0,07	1,71	1,78	0,07	1,74	1,58	-0,16	1,65
40	1,59	1,41	-0,18	1,69	1,76	0,07	1,77	1,91	0,14	1,63	1,68	0,05	1,68
80	1,80	1,64	-0,16	1,86	1,66	-0,20	1,65	1,57	-0,08	1,85	1,66	-0,19	1,71
Médias	1,65	1,50	-0,15	1,76	1,69	-0,07	1,71	1,75	0,04	1,74	1,64	-0,10	1,68
	1,57			1,73			1,73			1,69			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 5 repetições.

#### 7.2.3.2 Safra 2005/2006

**Tabela 27.** Número de plantas de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030 e BRS 106 na safra, inoculados ou não com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS 106			
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	Médias
0	36	37	1	14	12	-2	38	39	1	29
40	37	38	1	15	11	-4	39	36	-3	29
80	35	30	-5	21	11	-10	39	36	-3	29
Médias	36	35	-1	17	11	-5	39	37	-2	29
	36			14			38			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 6 repetições.

**Tabela 28.** Número de espigas de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030 e BRS 106 na safra, inoculados ou não com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS 106			
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	Médias
0	16	14	-2	13	12	-1	16	14	-2	14
40	15	16	1	17	13	-4	16	15	-1	15
80	15	16	1	14	12	-2	16	17	1	15
Médias	15	15	0	15	12	-2	16	15	-1	15
	15			14			16			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 6 repetições.

**Tabela 29.** Percentual de N (%) nos grãos de genótipos de milho SHS 5050, BR 1030 e BRS 106 na safra, inoculados ou não com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417, sob diferentes doses de adubação nitrogenada (40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) e sem adubação nitrogenada.

Trat.	SHS 5050			BR 1030			BRS 106			
Nitrogênio	NI	I	INCR	NI	I	INCR	NI	I	INCR	Médias
0	1,35	1,39	0,04	1,59	1,61	0,02	1,51	1,52	0,01	1,50
40	1,33	1,42	0,09	1,76	1,70	-0,06	1,67	1,62	-0,05	1,58
80	1,50	1,44	-0,06	1,77	1,77	0,00	1,69	1,60	-0,09	1,63
Médias	1,39	1,42	0,02	1,71	1,69	-0,01	1,62	1,58	-0,04	1,57
	1,41			1,70			1,60			

Os valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral. Médias de 6 repetições.