

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GLEBERSON GUILLEN PICCININ

Biorregulador, inoculação com *Azospirillum brasilense*, doses de nitrogênio nos componentes do rendimento e qualidade de sementes de milho

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
ABRIL – 2015

GLEBERSON GUILLEN PICCININ

Biorregulador, inoculação com *Azospirillum brasilense*, doses de nitrogênio nos componentes do rendimento e qualidade de sementes de milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
ABRIL – 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P588b Piccinin, Gleberon Guillen
Biorregulador, inoculação com *Azospirillum*
brasilense, doses de nitrogênio nos componentes do
rendimento e qualidade de sementes de milho /
Gleberon Guillen Piccinin. -- Maringá, 2015.
143 f. : il., figs., tabs. + apêndice

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini.
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, 2015.

1. *Azospirillum brasilense* - Milho (*Zea mays* L.)
- Bactéria diazotrófica endofítica. 2. *Azospirillum*
brasilense - Milho (*Zea mays* L.) - Regulador
vegetal. 3. *Azospirillum brasilense* - Milho (*Zea*
mays L.) - Nitrogênio. 4. *Azospirillum brasilense* -
Milho (*Zea mays* L.) - Germinação. I. Braccini,
Alessandro Lucca, orient. II. Scapim, Carlos
Alberto, coorient. III. Universidade Estadual de
Maringá... III. Título.

CDD 21.ed. 633.15

MN-001994

GLEBERSON GUILLEN PICCININ

Biorregulador, inoculação com *Azospirillum brasilense*, doses de nitrogênio nos componentes do rendimento e qualidade de sementes de milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Agronomia.

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
(Membro)

Prof. Dr. Paulo Sergio Lourenço de
Freitas
(Membro)

Prof. Dr. Pedro Soares Vidigal Filho
(Membro)

Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim
(Membro)

Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini
(Presidente)

Dedico

“A minha família, amigos e em especial a minha filha”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo valoroso patrocínio da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini pela orientação, compreensão e comprometimento.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Scapim, pelas inestimáveis colaborações como Co-orientador.

Ao NUPAGRI – Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura pelo apoio concedido nas pesquisas.

À Érika Cristina Takamizawa Sato, Secretária do PGA, pela atenção dedicada e amizade.

Em especial a todos os professores, funcionários e acadêmicos que contribuíram diretamente ou indiretamente pela elaboração e execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho: Ana Carla Borghi, Lilian Gomes de Moraes Dan, Raissa Marrafon Ponce, Gildo Ferreira Duarte, Fernanda Brunetta Godinho, Luiz Henrique da Silva Lima, Thiago Toshio Ricci, Andréia Kazumi Suzukawa, Giovanna Emanuelle G. Mariucci, Fernanda Bassani, Jhonatann P. Bueno, Willian C. Dolfini, Luiz Fernando Sibut Neto, Rafael Rossi Sibut, Arthur de Canini Cezar, Fernando Botti, Fernando Sperandio Cremm, Priscila Angelloti, Juliana Marques Voroniak, Alan A. Donel, Paulo Vinicius D. Vieira, Alex Henrique T. Ortiz, Ricardo Shigueru Okumura, Antônio Augusto N. Franco, Allan Klynger da S. Lobato e Gabriel Loli Bazo.

BIOGRAFIA

GLEBERSON GUILLEN PICCININ nasceu no dia 06 março de 1985, em Alto Piquiri, Estado do Paraná. Na infância seguiu os passos de seu pai na pequena propriedade rural, participando de todas as atividades desenvolvidas na lavoura de algodão e de trigo.

Cursou o Ensino Fundamental e Básico na Escola Duque de Caxias no Distrito de Paulistânia. O Ensino Médio teve início no Colégio Estadual João Papa XXIII de Alto Piquiri e concluiu na Escola Técnica Agrícola Engenheiro Herval Bellusci, em 2003, em Adamantina, Estado de São Paulo.

Em 2003 concluiu o Curso de Técnico em Agricultura e Técnico em Administração Rural e participou de vários projetos e eventos bem como estagiou na Cooperativa Mista Vale do Piquiri, em parceria com a empresa IHARA no Projeto “Olho Vivo”.

Graduou-se em Agronomia no dia 14 de janeiro de 2010, pela Universidade Estadual de Maringá. Em março de 2010 ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia e concluiu-o em 2012.

Iniciou o Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá em 2012 e apresentou-se à Banca Examinadora para o Exame de Qualificação em dezembro de 2014, sendo Aprovado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
RESUMO	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Perspectivas da cultura de milho no mundo e no Brasil.....	3
2.2 Ecofisiologia do milho.....	6
2.3 Nitrogênio na cultura do milho.....	9
2.4 <i>Azospirillum brasilense</i>	13
2.5 Reguladores vegetais no desempenho agronômico.....	18
2.6 Biorregulador vegetal.....	21
2.7 Potencial fisiológico das sementes.....	25
3. REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO I	46
Desempenho agronômico do milho em resposta à inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , associado a doses de nitrogênio e biorregulador.....	46
Agronomic performance of corn in response to seed inoculation with <i>Azospirillum brasilense</i> , associated with nitrogen doses and bioregulator..	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Instalação e condução dos experimentos.....	51
2.1.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental.....	53
2.2 Avaliação do desempenho agronômico.....	56
2.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	58
2.4 Análise financeira.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62

4. CONCLUSÕES.....	82
5. REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO II.....	95
Inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de nitrogênio e biorregulador na qualidade fisiológica e composição de sementes de milho.....	95
Inoculation with <i>Azospirillum brasilense</i> , nitrogen and regulator on the physiological quality and composition of corn seeds.....	96
1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 Instalação e condução dos experimentos.....	100
2.1.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental.....	102
2.2 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes.....	105
2.3 Avaliação da composição química das sementes.....	106
2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	108
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
4. CONCLUSÕES.....	127
5. REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICE.....	137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Resultados da análise de fertilidade do solo na camada de 0 - 20 cm para o solo Argissolo Vermelho distroférico, antes da implantação da cultura.....	51
Tabela 2	Características do inoculante utilizado à base de <i>Azospirillum brasilense</i> , produto comercial Marterfix Gramíneas Líquido [®] , em dois anos agrícolas.....	53
Tabela 3	Esquema dos tratamentos de inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de N associado a biorregulador, em dois anos agrícolas.....	54
Tabela 4	Resumo da análise de variância conjunta, referente às variáveis respostas: altura de plantas (A.P), número de fileiras de grãos por espiga (N.F.G.E), número de grãos por fileira (N.G.F), massa de mil grãos (M.M.G), teor foliar de N (T.F.N) e produtividade (PROD.) em função da inoculação de sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas.....	64
Tabela 5	Resultados médios da altura de plantas (m), em diferentes doses de N, em dois anos agrícolas.....	65
Tabela 6	Resultados médios do número de fileiras de grãos por espiga, em função de diferentes doses de N, em dois anos agrícolas.....	67
Tabela 7	Resultados médios do número de grãos por fileira, sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, associado à aplicação do biorregulador na ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B), em dois anos agrícolas.....	69
Tabela 8	Resultados médios da massa de mil grãos, sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, em	

	manejo com biorregulador: ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B), em dois anos agrícolas.....	72
Tabela 9	Resultados médios do teor foliar de nitrogênio em (g. KG), sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, em dois anos agrícolas.....	74
Tabela 10	Resultados médios da produtividade (kg ha ⁻¹), sob efeito da inoculação: não inoculado e inoculado em manejo do biorregulador: ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B).....	78
Tabela 11	Resultados da análise de rentabilidade da cultura do milho, em função do desdobramento de <i>Azospirillum</i> x Biorregulador. Médias da produtividade das doses de N para os dois anos agrícolas.....	81
Tabela 1A	Características agronômicas do híbrido de milho 30F35 YH.....	138
Tabela 2A	Resumo das análises de regressões para altura de planta (A.P), número de fileiras de grãos por espiga (N.F.G.E), número de grãos por fileira por espiga (N.G.F), massa de mil grãos (M.M.G), produtividade (PROD.) e teor foliar de N (T.F.N).....	139
CAPÍTULO II		
Tabela 1	Resultados da análise de fertilidade do solo na camada de 0 - 20 cm para o solo Argissolo Vermelho distroférico, antes da implantação da cultura.....	100
Tabela 2	Características do inoculante utilizado à base de <i>Azospirillum brasilense</i> , Marterfix Gramíneas Líquido [®] em dois anos agrícolas.....	102
Tabela 3	Esquema dos tratamentos de inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de N, associado ao manejo de biorregulador, em dois anos agrícolas.....	103
Tabela 4	Resumo da análise de variância conjunta, referente às	

	variáveis respostas: plântulas normais (P.N), contagem final (C.F), teste de frio modificado (F.M) e condutividade elétrica (C.E) em função da inoculação de sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas.....	110
Tabela 5	Resultados médios da contagem final do teste de germinação de sementes de milho entre anos agrícolas e não inoculado e inoculado em dois anos agrícolas.....	113
Tabela 6	Resultados médios do teste de condutividade elétrica das sementes de milho ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) na análise do desdobramento de anos agrícolas dentro de cada nível de <i>Azospirillum</i> e biorregulador, em dois anos agrícolas...	117
Tabela 7	Resumo da análise de variância conjunta, referente às variáveis respostas: conteúdo de óleo, proteína e nitrogênio nas sementes de milho em função da inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas.....	120
Tabela 8	Conteúdo de óleo nas sementes de milho, em g kg^{-1} , na análise do desdobramento de anos agrícolas dentro de cada nível de <i>Azospirillum</i>	121
Tabela 3A	Resumo das análises de regressões para plântulas normais da germinação (P.N), contagem final da germinação (C.F), frio modificado (F.M), condutividade elétrica (C.E), conteúdo de óleo, proteína (P) e N.....	140
Tabela 4A	Desdobramento de <i>Azospirillum</i> /anos agrícolas* Doses*Biorregulador.....	143

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Produção mundial de milho no período de 1970 – 2014. Fonte: (FAO, 2015).....	3
Figura 2	Produção nacional de milho no período de 1976 – 2014. Fonte: (CONAB, 2015).....	4

CAPÍTULO I

Figura 1	Dados climáticos diários da precipitação pluvial, temperaturas máximas e mínimas ocorridas durante o período experimental para os anos agrícolas 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b).....	52
Figura 2	Regressão polinomial da altura de plantas (m) em resposta ao aumento da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador em dois anos agrícolas.....	66
Figura 3	Regressão polinomial do número de fileiras de grãos por espiga, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.....	68
Figura 4	Regressão polinomial do número de grãos por fileira, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	71
Figura 5	Regressão polinomial da massa de mil grãos, em função adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação	

	com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	73
Figura 6	Regressão polinomial do teor de nitrogênio nas folhas, em função da adubação nitrogenada, independente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.....	76
Figura 7	Regressão polinomial da produtividade, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	79
 CAPÍTULO II		
Figura 1	Dados climáticos diários da precipitação pluvial, temperaturas máximas e mínimas ocorridas durante o período experimental para os anos agrícolas 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b).....	101
Figura 2	Regressão polinomial de plântulas normais de sementes de milho, em resposta adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	111
Figura 3	Regressão polinomial da germinação de sementes de milho, em resposta ao aumento da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	114
Figura 4	Regressão polinomial da porcentagem de plântulas normais, obtidas pelo teste de frio das sementes de milho como indicativo de vigor, em resposta a adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	116
Figura 5	Regressão polinomial da condutividade elétrica das sementes de milho, em resposta a adubação	

	nitrogenada, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	118
Figura 6	Regressão polinomial do conteúdo de óleo nas sementes de milho, em função as doses de N, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	122
Figura 7	Regressão polinomial do conteúdo de proteína nas sementes de milho em porcentagem, em função das doses de N, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.....	124
Figura 8	Regressão polinomial para conteúdo de nitrogênio nas sementes de milho, em função das doses de nitrogênio, independentemente da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.....	126

RESUMO

PICCININ, Gleberson Guillen, D.S., Universidade Estadual de Maringá, abril de 2015. **Biorregulador, inoculação com *Azospirillum brasilense*, doses de nitrogênio nos componentes do rendimento e qualidade de sementes de milho.** Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini. Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência agronômica da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, associado a doses de nitrogênio e manejo com biorregulador no desempenho agronômico, produtividade e na qualidade fisiológica das sementes da cultura do milho. Foram conduzidos nos experimentos o híbrido simples de milho Pioneer 30F35 YH nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012 na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Os tratamentos foram constituídos da ausência e presença da inoculação das sementes com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* na formulação líquida, doses da adubação nitrogenada (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha⁻¹), aplicadas na base e em cobertura, em associação com a aplicação foliar do biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹), no estágio V₄. O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos casualizados com seis repetições, em esquema fatorial (2 x 5 x 2). Diante dos resultados é possível inferir que o tratamento de sementes com inoculante não influenciou na altura de plantas e no número de fileiras de grãos. O uso do inoculante não substituiu totalmente as adubações nitrogenadas no milho. A interação entre a aplicação de 250 mL ha⁻¹ de biorregulador em V₄ e a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, não proporcionou incrementos significativos na produtividade. A inoculação com *Azospirillum brasilense* via sementes proporcionou incrementos de 11% na produtividade, seguido do incremento do número grãos por fileira e no teor foliar de nitrogênio. A inoculação das sementes de milho proporcionou retorno na ordem de R\$ 303,00 ha⁻¹. O aumento da dose de N pode contribuir para a melhoria da qualidade fisiológica da semente de milho. A aplicação de 113 kg ha⁻¹ de N afeta positivamente o vigor das sementes, expresso pela primeira contagem da

germinação e pelo teste de frio modificado. Os conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio nas sementes foram alterados positivamente, em função das doses de N. A aplicação de 250 mL ha⁻¹ do biorregulador não influenciou na germinação, bem como nos conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio das sementes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactéria, regulador vegetal, produtividade, germinação.

ABSTRACT

PICCININ, Gleberson Guillen, D.S., State University of Maringá, April 2015. **Bioregulator, inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen doses in the components of yield and quality of corn seeds**. Adviser: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini. Co-adviser: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.

The objective of the work was to evaluate the agronomic efficacy of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen doses and handling with bioregulator on agronomic performance, yield and seeds physiological quality of corn culture. Experiments were conducted in the simple hybrid maize Pioneer 30F35 YH in the agricultural years 2010/2011 and 2011/2012 at the Experimental Farm of Iguatemi that belongs to the State University of Maringá. Treatments were constituted in the absence and presence of seed inoculation with bacteria of the *Azospirillum brasilense* species in the liquid formulation, nitrogen fertilization doses (0.0, 45, 90, 135 and 180 kg of N ha⁻¹) applied to the base and top-dressing, in association with foliar application of bioregulator (0.0 and 250 mL ha⁻¹) in the V₄ stage. The experimental design used was in randomized complete blocks with six replications, in factorial scheme (2 x 5 x 2). Facing results it is possible to infer that seed treatment with inoculant did not influence the plant height and number of grain rows. The use of inoculant does not fully replace the nitrogen fertilization in corn. The interaction between the application of 250 mL ha⁻¹ of bioregulator in V₄ and seed inoculation with *Azospirillum brasilense* did not provide significant increments in yield. Inoculation with *Azospirillum brasilense* in seeds provided increments of 11% in productivity, followed by the increase in grain number per row and leaf nitrogen content. Inoculation of corn seeds provided returns of R\$ 303.00 ha⁻¹. Increasing N rate can contribute to the improvement of the physiological quality of maize seed. The application of 113 kg ha⁻¹ of N positively affects seed germination, expressed by the first count of germination and by the modified cold test. Oil, protein, and nitrogen contents in the seeds have changed positively, depending on nitrogen rates. The application of 250 mL ha⁻¹ of bioregulator did not affect germination as well as oil, protein and nitrogen content of corn seeds.

Keywords: *Zea mays* L., bacterium, vegetal regulator, productivity, germination.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho vem alcançando ganhos expressivos de produtividade nos últimos anos no Brasil. Nos últimos anos agrícolas, a cultura do milho experimentou um novo patamar de produtividade de 4,9 t ha⁻¹, só antes alcançado por países considerados desenvolvidos e detentores de altas tecnologias. Considerando os níveis de produtividade de anos agrícolas normais, sobretudo na região Centro-Sul do País, a produção brasileira de milho na 1ª Safra atingiu 30,3 milhões de toneladas, que, adicionadas ao volume estimado na 2ª Safra totalizará uma produção de 78,9 milhões de toneladas no ano agrícola de 2014/2015 (CONAB, 2015).

Novas tecnologias têm sido empregadas visando o incremento na produção da cultura do milho, incluindo o uso crescente de sementes melhoradas, associado à aplicação via semente de fungicidas, inseticidas e reguladores vegetais. Dentre as inovações tecnológicas desenvolvidas para a cultura do milho nos últimos anos, a fim de se diminuir o custo de produção e aumentar a produtividade, pode-se citar o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, utilização de diferentes espaçamentos e arranjos de plantas, diferentes formas de adubação, inoculação das sementes com bactérias diazotróficas, aplicação de biorreguladores, entre outras práticas.

O milho, por ser uma cultura que demanda grandes quantidades de adubo nitrogenado usualmente requer manejo adequado de nitrogênio. Por isso, a inoculação das sementes com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* pode resultar em incrementos de produtividade e na diminuição dos custos de produção, principalmente na aquisição de adubos nitrogenados.

Contudo, os trabalhos relacionados com aplicação de biorreguladores, na cultura do milho, são incipientes, quando se associa a inoculação com a *Azospirillum brasilense*. Portanto, é extremamente válida a realização de pesquisas alternativas, que contribuam na formação de um posicionamento, quanto ao manejo de biorreguladores com a aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*.

O trabalho tem como hipótese básica verificar as possíveis interações da inoculação das sementes com as estirpes AbV5 e AbV6 com doses de nitrogênio e biorregulador em diminuir a adubação química nitrogenada na base.

O objetivo foi avaliar a eficiência agronômica da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, associado a doses de nitrogênio e manejo com biorregulador no desempenho agronômico, produtividade e na qualidade fisiológica das sementes de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Perspectivas da cultura do milho no mundo e no Brasil

A cultura do milho (*Zea mays* L.) pertence à tribo *Maydes*, subfamília *Panicoideae* e família *Poaceae*. Representa um dos principais cereais cultivados em todo mundo, destacando-se o Brasil como terceiro maior produtor mundial.

Atualmente, o milho é a maior cultura agrícola do mundo e o futuro reserva um papel ainda mais importante para o cereal. O crescimento da renda de países emergentes tem levando ao aumento de consumo mundial de proteína animal, mercado no qual o milho se destaca como principal insumo das rações. Assim, mesmo sem considerar as potencialidades do etanol de milho, o fato é que o mundo demandará ainda mais o cereal nas próximas décadas (EMBRAPA, 2014).

A produção anual mundial de milho (Figura 1) no período de 1970-2014 passou de 205 para cerca de 945,8 milhões de toneladas, atingindo níveis de produtividade como nunca antes imaginados na cultura (FAO, 2015).

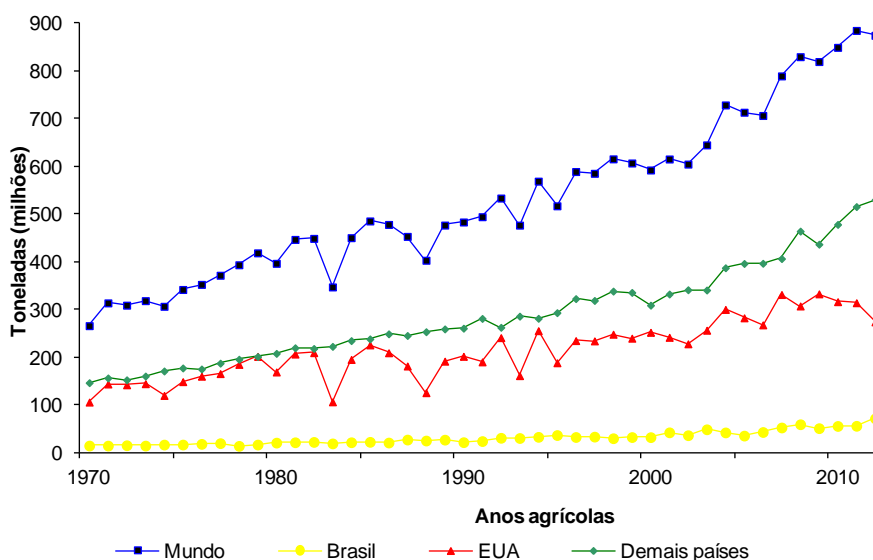


Figura 1. Produção mundial de milho no período de 1970 – 2014. Fonte: (FAO, 2015).

Conforme os dados da Conab (2015), nos últimos 38 anos (Figura 2), a área cultivada com milho no Brasil cresceu 52%, enquanto que a demanda teve um salto de 283,3%. No ano agrícola 1972/73, a produtividade média alcançada no milho no Brasil, era de apenas 1.424 kg ha⁻¹, enquanto que para o ano agrícola 2014/2015, estima-se uma produtividade média de 5.208 kg ha⁻¹, considerando as duas safras anuais.

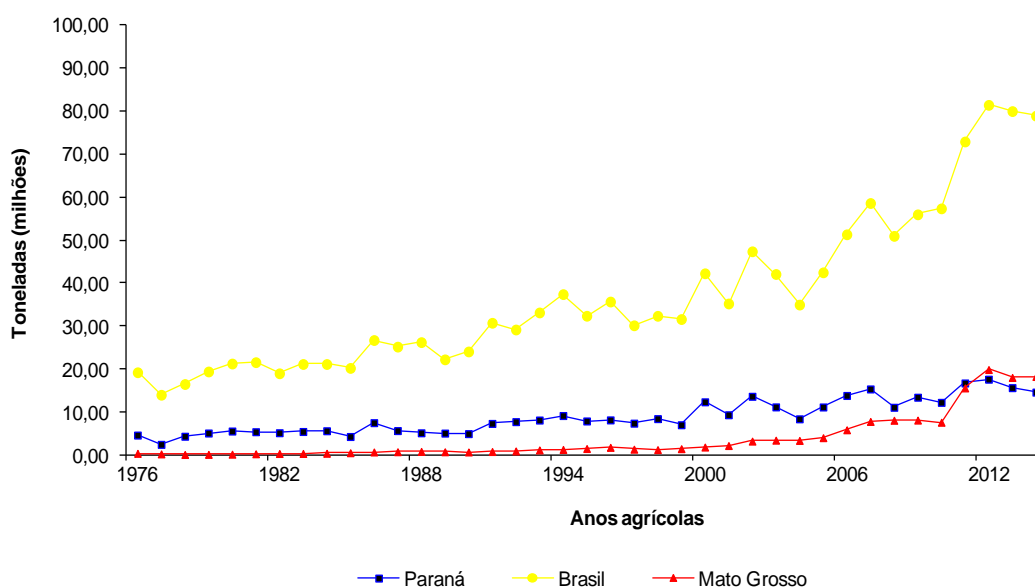


Figura 2. Produção nacional de milho no período de 1976 – 2014. Fonte: (CONAB, 2015).

A produtividade média das lavouras nacionais de milho é considerada baixa, quando comparada com o potencial produtivo desse cereal. De acordo com os dados da Conab 2015, o Paraná possui produtividade média de 8,6 t ha⁻¹ e na “safreinha” apresenta produtividade média de 5,3 t ha⁻¹ para ano agrícola 2014/2015. Essa produtividade de verão comparada com a produtividade média dos EUA cabe ressaltar que esta nos mesmos patamares de tecnologias utilizadas para incrementar a produtividade da cultura.

A incidência de pragas e doenças e a competição com plantas invasoras e o manejo do solo estão entre os principais fatores que reduzem a produtividade das lavouras (FORSTHOFER et al., 2006; VIDAL et al., 1999). Por isso, as utilizações de material genético de alto potencial e o uso de práticas adequadas de manejo podem contribuir para aumentar a produtividade

das lavouras, a exemplo do que ocorreu nos últimos anos, em virtude da geração de resultados de pesquisa e difusão de informações tecnológicas.

A inserção do milho no mercado global é mais recente do que a soja, na qual figura no mercado internacional desde a década de 70. O Brasil passou a ter importância no mercado mundial de milho no ano 2000, após a desvalorização do Real iniciada em 1999. Antes desse período, o Brasil era praticamente autossuficiente em milho, importando o produto nos anos de déficit de produção, mas raramente obtendo grandes excedentes exportáveis para países desenvolvidos como a Rússia e EUA (EMBRAPA, 2014).

No Paraná a cultura voltou a perder área para a soja em decorrência das vantagens relacionadas à liquidez e rentabilidade. A área apresentou um decréscimo de 18,4% em relação ao exercício passado, repercutindo fortemente na produção estadual, cujos reflexos só não foram maiores em função do bom desempenho do clima (CONAB, 2015).

Em termos mundiais e nos últimos anos a relação milho/soja tem estado neste nível de 3:1, o que não é coincidência, pois tal razão também é observada nos EUA. Em 2011, essa relação nos Estados Unidos foi de 3,77, mas que se reduz a 2,5 quando é excluído o milho para etanol (120 milhões de toneladas). A relação é mais baixa no caso do Brasil, de apenas 1,10/1 em 2012. Isso poderá ter sérios impedimentos futuros para a produção de carnes internamente. Assim, caso se queira realmente transformar o milho e a soja do Brasil em proteínas animais há que se aumentar a proporção produtiva de milho/soja para pelo menos 2:1 (EMBRAPA, 2014).

Desta forma, em virtude da importância econômica da cultura, aliados aos elevados potenciais genéticos atualmente alcançados pelos híbridos modernos, necessita-se a adoção de novas tecnologias de manejo para a expressão desses potenciais de produtividade.

Para que maiores produtividades sejam obtidas, há necessidade da união de fatores extrínsecos e intrínsecos para que as plantas tenham um desempenho adequado, tais como: a) eficiência na absorção de água e nutrientes; b) transporte de nutrientes e água das raízes para a parte aérea, bem como de açúcares, aminoácidos, vitaminas e hormônios da parte aérea para as raízes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2 Ecofisiologia do milho

O crescimento da planta de milho é influenciada por variações de temperatura, disponibilidade hídrica e radiação solar. A produtividade de milho depende do número de grãos por unidade de área e da quantidade de fotoassimilados disponíveis para esse grão. É variável entre diferentes híbridos e é influenciada por fatores de ambiente que predominam no período em torno da polinização. Por isso, é importante detalhar os principais eventos fenológicos, morfológicos e fisiológicos associados ao desenvolvimento do milho (RODRIGUES; DIDONET, 2003).

A avaliação da ontogenia da planta de milho empregada por uma escala, subdivide o desenvolvimento da planta em estádios vegetativos e reprodutivos.

A escala de Ritchie, Hanway e Benson (1993) passou a ser adotada na descrição da fenologia do milho. Ela manteve grande parte dos critérios da escala de Hanway (1963), sobretudo nos estádios reprodutivos. Porém, os estádios vegetativos passaram a ter maior detalhamento. A cada nova folha totalmente expandida corresponde um estágio vegetativo. Os símbolos que representam os estádios vegetativos são formados pela letra V e um algarismo que corresponde ao número de folhas totalmente expandidas. Os estádios reprodutivos passaram a ter símbolos formados pela letra R e um algarismo correspondente à sequência dos mesmos estádios da escala de Hanway (1963).

Os estádios fenológicos da planta de milho, segundo escala de Ritchie, Hanway e Benson (1993) estão classificados em estádios vegetativos: VE (emergência), V1 (primeira folha), V2 (segunda folha), V3 (terceira folha), V(n) (enésima folha), VT (pendoamento) e em estádios reprodutivos: R1 (polinização), R2 (grão em bolha), R3 (grão leitoso), R4 (grão pastoso), R5 (grão dentado) e R6 (maturação fisiológica).

A temperatura apresenta-se como o elemento climático mais importante para prever os eventos fenológicos da cultura, desde que não haja deficiência hídrica. Com relação à temperatura base Berlatto e Matzenauer (1986) enfatizam que em geral se deve considerar a temperatura base inferior a 10°C para o cálculo da soma térmica da cultura do milho. Para Maluf et al,

(2000) as exigências térmicas da maioria dos genótipos de milho podem variar para os processos de germinação e crescimento, porém poucas desenvolvem com temperaturas inferiores a 10°C e as estimativas do limiar superior ou temperatura máxima para o milho estão na ordem de 19 a 34°C (TOLLENAAR; DAYNARD; HUNTER, 1979; RITCHIE; NESMITH, 1991).

As plantas “C4” são classificadas de acordo com a enzima descarboxilativa, o milho pertence àquele que apresenta a maior eficiência de uso da radiação solar ou eficiência quântica, com valor médio de 64,5 a 69 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, enquanto outras “C4” apresentam valores em torno de 52,6 a 60,4 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Esta maior eficiência é atribuída à anatomia das plantas que possuem este mecanismo, qual seja: menor área entre as nervuras e lamela suberizada, que previne a perda de CO₂ para o meio (HATTERSLEY, 1984). Várias respostas do milho aos elementos meteorológicos decorrem de seu mecanismo fotossintético “C4”, que resultam em alta produtividade e, em consequência, alto rendimento de grãos, superando outras espécies cultivadas. Estes conceitos são fundamentais, sobretudo quanto às interações da planta e o ambiente físico, com ênfase para radiação solar, CO₂, temperatura, água e nitrogênio (EHLERINGER et al., 1997).

Com relação à luz, a cultura do milho responde com altas produtividades a crescentes intensidades luminosas, em virtude de pertencer ao grupo de plantas “C4”. Desta maneira, o método de soma de graus-dias tem sido amplamente usado para relacionar o desenvolvimento das plantas com a temperatura ambiente e está fundamentado na premissa de que a planta necessita de um somatório térmico para completar determinada fase fenológica ou o ciclo total (BERGAMASHI, 2006; STORCK et al., 2009). No entanto, a planta precisa acumular quantidades distintas de energia ou unidades calóricas em cada etapa de crescimento e desenvolvimento. A unidade calórica é obtida através da soma térmica necessária para concluir cada etapa do ciclo da planta, desde o plantio até o florescimento masculino. O somatório térmico é calculado através das temperaturas máximas e mínimas diárias, sendo 30°C e 10°C, respectivamente, as temperaturas referenciais para o cálculo. Com base nas exigências térmicas da planta classificam-se as cultivares em normais ou tardias (890-1.200 graus-dias ou G.D.), precoces (831-890 G.D.) e superprecoces (780-830 G.D.) (CRUZ et al., 2006).

A produção vegetal depende de fatores intrínsecos à planta. Como exemplo, a fixação de CO₂, o aparato fotossintético e a arquitetura foliar. Arquitetura foliar, as dimensões e ângulo da folha, em relação ao plano vertical, são importantes determinantes da população e distribuição espacial de plantas (VIEIRA JUNIOR et al., 2006).

Em relação ao aparato fotossintético e a fixação de CO₂, o milho apresenta-se como um dos mais eficientes entre as plantas cultivadas. Por isso, a estrutura ideal de dossel é aquela que maximiza a interceptação da radiação e minimizam a irradiância, o que é obtido com a maximização e uniformidade do índice de área foliar da cultura (POMMEL et al., 2002; VIEIRA JÚNIOR et al., 2006).

A eficiência de interceptação depende da idade da folha, da arquitetura foliar, do arranjo espacial das plantas e da população empregada, ao passo que a eficiência de conversão, dentre outros fatores, depende principalmente da temperatura do ar, do estado nutricional e do equilíbrio hídrico das plantas (VIEIRA JÚNIOR, 1999; KINIRY et al., 2002).

Em relação ao déficit hídrico, a planta de milho apresenta alta sensibilidade, sobretudo quando ocorre no período reprodutivo, no qual a efetiva falta de água está associada à interferência nos processos de síntese de proteína e RNA (VAMERALI et al., 2003; WELCKER et al., 2007). Da mesma maneira, o milho é muito sensível ao excesso de água, necessitando de solos bem drenados para se desenvolver adequadamente (BERGAMASCHI et al., 2007; SHAO et al., 2008).

Cumpre, também, ressaltar que a necessidade hídrica em condições normais, raramente excede 3,0 mm dia⁻¹, enquanto a planta estiver com menos de 7-8 folhas. Todavia, durante o período compreendido entre o florescimento até a maturação, o consumo pode se elevar para 2,5 a 6,9 mm diários (BERGAMASCHI et al., 2001; RADIN et al., 2003).

O controle de água na planta é realizado, principalmente, pelos estômatos, cuja condutância é modulada, em geral, pela diferença na pressão de vapor entre o ambiente e a planta e por sinalizadores endógenos, notadamente o ácido abscísico (RIBAUT; PILET, 1991; WENSUO et al., 1996). Os reguladores de crescimento endógenos, além de modularem a condutância estomática e, conseqüentemente, a temperatura da planta, promovem

alterações como o murchamento e o enrolamento das folhas (VIEIRA JUNIOR et al., 2007).

Uma das primeiras tentativas de manter o nível hídrico no interior da planta, durante a fase vegetativa e florescimento, é o fechamento dos estômatos; porém, a consequência desse evento fisiológico é a restrição das trocas gasosas entre o interior da folha e a atmosfera. Isto causa redução na assimilação do CO₂ utilizado no processo fotossintético, o qual proporcionará perda quantitativa, pois as plantas definirão menor número de fileiras de grãos por espiga e de grãos por fileira (LARCHER, 2000; DETOMINI et al., 2009).

Características como número de espigas por planta (PEREIRA FILHO, 2003), tamanho da espiga (PEREIRA FILHO, 2003; SILVA et al., 2007), número de grãos por espiga (PEREIRA FILHO, 2003), altura de inserção da espiga, número de fileiras de grãos, peso de grãos e massa fresca de espigas comercializáveis (SILVA et al., 2003) são afetadas por população de plantas e pelas doses de nitrogênio. Por essa razão, o conhecimento da fisiologia da planta, em respeito às exigências edafoclimáticas da espécie, aliadas ao estabelecimento de estratégias de manejo de biorrelugador, associado à inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, em diferentes doses de nitrogênio, assumem caráter imperioso, na garantia de produtividades lucrativas e sustentáveis.

2.3 Nitrogênio na cultura do milho

Adubação com nitrogênio (N) e a utilização de novas tecnologias na cultura do milho, inegavelmente, têm sido uma das ferramentas que mais tem contribuído para o aumento de produtividade e estabilidade de produção.

Atualmente, é crescente a preocupação com a poluição dos recursos hídricos e da atmosfera, pelo uso de fertilizantes nitrogenados, em virtude desse nutriente estar sujeito a perdas por erosão do solo, lixiviação, volatilização e desnitrificação (FAGUEIRA; BALIGAR 2005; CARDOSO et al., 2011), além do elevado custo energético para a sua obtenção. Nesse sentido, tem sido estimulada a busca de alternativas que possibilitem maximizar economicamente a melhor dose, aliada a melhor época de aplicação desse

nutriente na cultura do milho (RAIJ et al., 1996; MAIA; SILVA, 2001; AMADO et al., 2002; LOPES et al., 2004; SOUSA; LOBATO, 2004).

Em plantas a importância do N se destaca por exercer importantes funções no metabolismo vegetal e por ser constituinte de todos os aminoácidos, fazendo parte da constituição de proteínas, bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), enzimas, fitocromos, coenzimas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), fitohormônios e molécula de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013; BISSANI et al., 2008; ANDRADE et al., 2003). Por participar da molécula de clorofila, a presença de N torna-se indispensável para a manutenção da atividade fotossintética, na qual, conseqüentemente, proporcionará maior crescimento e desenvolvimento dos drenos reprodutivos.

As plantas absorvem o N pela passagem de nitrato e amônio por meio da membrana plasmática (plasmalema) das células, da epiderme e do córtex da raiz, por meio de transportadores específicos para essas formas de nitrogênio (LARSSON; INGEMARSSON, 1989). Após a entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito, no citosol, por meio da enzima nitrato redutase. Posteriormente, é convertido a amônio no plastídio, pela ação da enzima nitrito redutase (LARSSON; INGEMARSSON, 1989).

Após a redução no plastídio, o amônio é incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e segue para a biossíntese de outros aminoácidos e seus metabólitos (CRAWFORD, 1995). Como alternativa, o nitrato e o amônio podem ser transportados por carregadores específicos, por meio do tonoplasto e armazenados no vacúolo (BORGES et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O nitrato e o amônio são absorvidos pelas plantas por processos dependentes de energia (BLOOM; SUKRAPANNA; WARNER, 1992). Uma bomba de prótons existente no plasmalema (H^+ – ATPase) hidrolisa ATP, bombeando íons H^+ para o exterior da célula, resultando em um gradiente de potencial eletroquímico (CRAWFORD, 1995). O gradiente de prótons produz uma força próton motriz, direcionando os íons hidrogênio do exterior da célula para o citosol (GLASS; SHAFF; KOCHIAN, 1992). Segundo Souza e Fernandes (2006), o gradiente de potencial eletroquímico permite a entrada de cátions no interior da célula. Os ânions são absorvidos acompanhando o fluxo

de prótons. Além disso, a absorção do amônio ocorre por meio de um transportador tipo uniporte, enquanto a absorção do nitrato é um processo ativo secundário, em simporte com dois íons hidrogênio. Contudo, a exigência energética da assimilação do amônio é menor do que a exigência energética para a assimilação do nitrato, em razão do primeiro não necessitar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A assimilação do N pode ocorrer na raiz ou nas folhas das plantas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Quando o N é metabolizado nas raízes, a energia é gerada no citosol, por meio do ciclo das pentoses e da glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico (OAKS; HIREL, 1985). A ferredoxina reduzida é usada nas reações que envolvem a nitrito redutase e a GOGAT, é reduzida no citosol pelo NADPH produzido pelo ciclo das pentoses (CRAWFORD, 1995). Nas raízes, há a necessidade de importação de carboidratos produzidos nas folhas para, após ser metabolizado, gerar energia e fornecer esqueletos de carbono para o processo de incorporação do N em aminoácidos (OAKS; HIREL, 1985; TURPIN et al., 1991; OAKS, 1994).

Nas folhas, a energia para as reações de assimilação do nitrogênio é acumulada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico no processo de respiração (OAKS; HIREL, 1985).

Sendo assim, o suprimento de N nos estádios 4 e 6, torna-se imprescindível, pois são nesses estádios fisiológicos que se define o número de grãos por espiga e maior aparato fotossintético, culminando na manifestação do potencial genético da planta (RITCHIE; NESMITH, 1991).

Por essa razão, o N é o elemento que causa maiores efeitos no acréscimo da produtividade da cultura do milho comum, conforme comprovado por Gomes et al. (2007) e Duete et al. (2008). Além do seu efeito sobre a produtividade, o N interfere em diversas características da planta como o aumento da massa de mil grãos (AMARAL FILHO et al., 2005), do número de espigas por planta (FERNANDES et al., 2005), da altura de plantas (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004; OKUMURA et al., 2011), da produção de massa seca da parte aérea (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004; DUETE et al., 2008), do diâmetro do colmo (MAR et al., 2003), do peso de espigas (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004), entre outras características.

Por outro lado, na tomada de decisão sobre a quantidade de N a aplicar, além do teor de matéria orgânica (MO), principal reservatório de N no solo, alguns fatores devem ser considerados, tais como: sistema de cultivo, rotação de culturas, condições edafoclimáticas, época e modo de aplicação, fonte de N e aspectos operacionais e econômicos (CERETTA; FRIES, 1997; AMADO; MIELNICKZUK, 2000; COELHO, 2006).

Dessa forma, sugere-se efetuar a quantificação da adubação nitrogenada em função da produtividade almejada, do genótipo utilizado, do tipo de solo, do clima, da época de semeadura, da cultura antecessora, da adubação anteriormente utilizada e do sistema de produção adotado (sequeiro ou irrigado; plantio direto ou convencional) (FORNASIERI-FILHO, 2007).

No solo, o N pode ser fornecido por fertilizantes orgânicos e minerais, por meio da mineralização da MO presente no solo, resultante de culturas antecessoras (ASSMANN et al., 2008) e, atualmente, tem-se destacado a contribuição da fixação biológica pelas bactérias do gênero *Azospirillum* spp.

A inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* vem ganhando destaque, em função de algumas vantagens, quando comparado à adubação mineral, principalmente pelo fato de não existirem perdas do N fixado, como ocorre com os fertilizantes minerais, o que gera melhor aproveitamento deste nutriente pelas plantas (HUNGRIA, 2011). Além disso, há evidências práticas de que, em diferentes condições, isto possa incrementar a produtividade do milho.

De acordo com Hungria (2011), a inoculação das sementes, associada à adição de 24 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 30 kg ha⁻¹ de N no estágio de florescimento, proporcionou produtividades médias de aproximadamente 7.000 kg por hectare. Por outro lado, Okon e Vanderleyden (1997), em pesquisa fundamentada em 22 anos de experimentos com inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* spp., concluíram que o ganho com *Azospirillum* spp., não está somente relacionado a sua capacidade de auxiliar no fornecimento para a planta de compostos nitrogenados resultantes da fixação biológica, mas, também, por meio da produção, pela bactéria, de substâncias promotoras de crescimento, como citocininas, auxinas e giberilinas (TIEN et al., 1979). Plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. apresentam a morfologia do sistema radicular alterada (aumento do número de radículas, do diâmetro médio das raízes

laterais e de adventícias), o que possibilita a exploração de maior volume de solo, e aumenta a superfície de absorção das raízes da planta (HADAS; OKON 1987).

O suprimento de N pode ser feito de várias formas, entre elas, o fornecimento do nutriente por meio de adubos minerais, orgânicos e fixação biológica parcial do nitrogênio, no qual as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP's) como o *Azospirillum brasilense*, podem aumentar a atividade da redutase do nitrato, quando associadas endofiticamente, e, também, disponibilizar nitrogênio pela fixação biológica, bem como auxiliar na produção de hormônios do crescimento vegetal (STRZELCZYK; KAMPER, 1994; CASSÁN et al., 2008).

Assim, considerando a responsividade de híbridos modernos, busca-se obter a melhor dose de N, associada ao benefício que a inoculação das sementes pode proporcionar na cultura do milho, as quais ainda não estão completamente esclarecidas.

2.4 *Azospirillum brasilense*

O N é o nutriente que mais influencia a produção agrícola, principalmente na região tropical, onde está presente a maior parte dos solos pobres da América Latina. Em solos pobres em N, somente culturas com sistema de fixação biológica de nitrogênio (FBN) eficiente, como as leguminosas em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* e algumas gramíneas, como a cana-de-açúcar associada com bactérias diazotróficas endofíticas, podem crescer de forma praticamente independente da disponibilidade de N do solo (DÖBEREINER; URQUIAGA; BODDEY, 1995).

O sucesso das BPCP's em interagir com plantas hospedeiras depende da sua capacidade para sobreviver e persistir no solo, bem como colonizar a rizosfera.

Esses microrganismos apresentam a capacidade de promover o crescimento de plantas por diferentes mecanismos, tais como: aumento na atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas; produção de hormônios como auxinas, citocininas, giberilinas; solubilização de fosfato; FBN; favorecem associações benéficas de plantas com micorrizas; e

umentam o número e o comprimento de pêlos radiculares e laterais. Por outro lado, podem agir indiretamente no crescimento como indutor de resistência, protegendo a planta de fungos do solo ou de bactérias fitopatogênicas, com a produção de sideróforos, chitinases, glucanases e antibiose (ABBSI et al., 2011; FISCHER et al., 2007; STRZELCZYK et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 2004; BASHAN et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007; EMBRAPA, 2007; PERRIG et al., 2007; CASSÁN; GARCIA, 2008; REIS JUNIOR et al., 2008; WHIPPS, 2001; BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

As BPCP's estão sendo usadas em todo o mundo como bioinoculantes para estimular o crescimento das plantas em diferentes ambientes sob estresses, como metais pesados (MA et al., 2009; WANI; KHAN, 2010), herbicidas, (AHEMAD; KHAN, 2011a; AHEMAD; KHAN, 2010), inseticidas (AHEMAD; KHAN, 2011b), fungicidas (AHEMAD; KHAN, 2012; AHEMAD; KHAN, 2011c), salinidade (MAYAK et al., 2004), entre outras situações.

O gênero *Azospirillum*, em sua maioria, são bactérias de vida livre, gram-negativas, uniflageladas em forma de bastonete, aeróbicas curvas, colonizadoras de raízes de ampla faixa hospedeira (YOUNG, 1992; BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASHAN et al., 2004). No entanto, estão classificadas em 13 espécies principais: *A. halopraeferans* (REINHOLD et al., 1987), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997), *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. doebereinae* (ECKERT et al., 2001), *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadensis* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zea* (MEHNAZ, et al., 2007b), *A. picis* (LIN et al., 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010) e, recentemente, *A. formosense* (LIN et al., 2009) entre outros.

Desta forma, existem dois tipos de associações radiculares, uma endofítica e outra epifítica. Em relação à associação endofítica, ocorre a colonização pela *Azospirillum* spp. dos espaços intercelulares das células da epiderme e do córtex radicular na zona de alongamento e formação de pelos radiculares, os quais muitas vezes não apresentam sinais de ruptura. De acordo com Dobereiner (1992), quando uma população se estabelece na rizosfera, uma população interna também se desenvolve especialmente nos espaços intercelulares e vasos do protoxilema, no qual as concentrações de oxigênio são mais baixas e, conseqüentemente, favorecem a atividade da

fixação do N. No segundo aspecto, a bactéria coloniza indistintamente toda a superfície radicular, formando pequenos agregados e raramente coloniza a superfície dos pelos radiculares.

O crescimento das plantas, tanto na parte aérea quanto em raízes, é proporcionado também pela melhor disponibilidade de nitrogênio pelas bactérias. No entanto, as bactérias associativas como *Azospirillum* spp., ao contrário das simbióticas, que suprem toda a necessidade por nitrogênio das plantas leguminosas, excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização promovida pelas bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas. Contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011). Assim, os microrganismos associativos juntam-se às plantas para promover aumento na produtividade e atribuir resistência aos estresses bióticos e abióticos, capazes de reduzir o N₂ em amônia, de forma assimilável pelas plantas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON 2003).

A avaliação da quantidade de N₂ biologicamente fixada pelas gramíneas vem sendo estudada pela técnica isotópica com ¹⁵N e balanço do N total (MIRANDA; BODDEY, 1987). O *Azospirillum brasilense* tem proporcionado aumento na produção dos cereais na ordem de 10 a 30%, variando com a ocorrência natural de bactérias fixadoras existentes no solo e com a gramínea cultivada (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Existem variações entre genótipos de milho na resposta ao N assim como interações entre o milho e as bactérias diazotróficas e, ou, promotoras de crescimento são dependentes dos genótipos da planta e dos microrganismos envolvidos nessas associações (HAMEEDA et al., 2006; MENDONÇA et al., 2006). A interação positiva entre estas bactérias e o milho tem sido demonstrada por vários autores e, embora ainda não seja prática agrícola consolidada, levantamentos de diversos experimentos realizados em inúmeros países, indicam que a inoculação com *Azospirillum* spp. resulta, na maioria dos casos, em aumento de matéria seca, de produção de grãos e de acúmulo de N nas plantas inoculadas, particularmente quando envolveu genótipos não

melhorados, em presença de baixa disponibilidade de N (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Além do mais, podem induzir as plantas a respostas fisiológicas como nos estudos de Bashan et al. (2006), no incremento de vários pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila *a* e *b*, bem como em pigmentos fotoprotetivos auxiliares, como violaxantina, zeaxantina, aeroxantina, luteína, neoxantina, que resultariam em plantas mais verdes e sem estresse hídrico.

Pelos menos três vias biossintéticas foram descritas na produção de AIA em *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, como a via indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e uma outra independentemente de triptofano (DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000). Recentemente foi revelado que a enzima indole-3-piruvato decarboxilase, codificada pelo gene *ipdC*, é comum as duas vias IpyA e a via que independe de triptofano, cujo precursor ainda é desconhecido, sendo possível que ambas tenham início em um intermediário comum, o IpyA (LAMBRECHT et al., 2000). Por outro lado, o desempenho do *Azospirillum* spp. pode ser influenciado por fatores como adaptação a diferentes tipos de solo (OLIVEIRA et al., 2009.), diferentes condições climáticas (SAHARAN; NEHRA, 2011) e de variabilidade na resposta aos genótipos (HAN; NEW, 1998).

Kennedy et al. (2004) destacaram que a maioria dos experimentos conduzidos com a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum* proporcionou produtividades de, aproximadamente, 25%. Essa contribuição das bactérias é maior, quando as plantas recebem doses viáveis de fertilizantes nitrogenados (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON 2003).

O fato de a bactéria ser pouco exigente em relação às condições de solo para fixar N, torna mais difícil a introdução de estirpes de bactérias com maior capacidade de fixação, pela competição e, por esse motivo, um dos fatores relevantes na seleção de estirpes para inoculação é a capacidade de competir com aquelas existentes no solo (HUNGRIA, 2011).

Resultados obtidos por Okon e Labandera-Gonzalez (1994), com *A. brasilense* e *A. lipoferum* em diversas culturas, indicaram que em 65% dos ensaios os resultados foram positivos, com incrementos de 5 a 30% na produtividade. Em geral, o uso do inoculante proporciona redução de 40 a 50% no uso de fertilizantes nitrogenados. Neste sentido, o *Azospirillum brasilense*,

quando inoculado via semente, incrementa a produtividade da cultura do trigo (BARBIERI et al., 1993; SWEDRZYNSKA, 2000; ROESCH et al., 2005; PICCININ, et al., 2011; PICCININ et al., 2013), do milho (CAVALLET et al., 2000; SAIKIA et al., 2007; REIS JUNIOR et al., 2008; MEHNAZ, et al., 2010; BRACCINI et al., 2012), proporcionando aumento no crescimento da parte aérea e da raiz das plântulas de arroz (EMBRAPA, 2003), milheto (BOUTON et al., 1985) e cana-de-açúcar (BODDEY, 1995).

Tem sido verificado que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção. Tais mecanismos permitem classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes, dentre eles: produção de melanina, poli- β -hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos, formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula (BASHAN; LEVANONY, 1990; DEL GALLO; FENDRIK, 1994).

A inoculação da bactéria *Azospirillum* spp. tem sido realizada na cultura do milho e em outras gramíneas. Pesquisas revelaram que há aumento de produtividade dessas culturas com a utilização de tal tecnologia.

Estudando a resposta de vários genótipos de milho à inoculação de quatro estirpes de *Azospirillum* spp. isoladas na Argentina e três de raízes de sorgo e milho isoladas no Brasil, Salomone e Döbereiner (1996) constataram aumento da massa de grãos, variando em diferentes genótipos, da ordem de 1.700 a 7.300 kg ha⁻¹. Entretanto, esses resultados são muito influenciados pelas condições de solo, ambiente e genótipos avaliados.

Em outro estudo, Hungria et al. (2010) relatam os efeitos positivos da interação entre *Azospirillum* spp. e o milho, como aumento na produção de matéria seca, produção de grãos e acúmulo de nitrogênio em plantas inoculadas, principalmente quando genótipos não melhorados foram envolvidos na presença de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Muitas são as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, sobretudo na presença de elevadas dosagens de nitrogênio, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio (DIDONET et al., 1996).

Cavallet et al. (2000) demonstraram a eficiência de bactérias diazotróficas, em associação com gramíneas, e propuseram o uso de um produto comercial a base de *Azospirillum* spp. A produtividade de grãos de milho foi aumentada de 5.211 kg ha⁻¹ para 6.067 kg ha⁻¹, ou seja, aumento na ordem de 17%. O comprimento médio das espigas passou de 13,6 para 14,4 cm, um aumento de 6%, sem alterar a altura da planta nem o número de fileiras de grãos por espiga. A aplicação de nitrogênio na semeadura e/ou em cobertura não causou efeito sobre a produtividade do milho.

Estudos desenvolvidos por Lana et al. (2012) indicaram que a inoculação com *Azospirillum* spp., na ausência de adubação nitrogenada, proporcionou incrementos médios na produtividade do milho de 11,25%. Produtividade semelhante à obtida com 100 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Apesar dos estudos de inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* ainda serem incipientes, eles indicam o potencial de utilização destes microrganismos como fornecedores de aportes adicionais de N, bem como, promotores de crescimento das plantas, principalmente, pelo efeito hormonal de crescimento de raízes, o qual indiretamente resulta em maior absorção de nutrientes.

2.5 Reguladores vegetais no desempenho agrônomico

Uma prática ainda não consolidada na cultura do milho no Brasil é a aplicação de biorreguladores. Os biorreguladores vegetais são substâncias sintéticas que, aplicadas exogenamente, possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais clássicos (citocininas, giberelinas, ácido indolacético e etileno) (VIEIRA; CASTRO, 2002). Essas substâncias, em baixas concentrações, inibem, promovem e/ou modificam processos morfológicos e fisiológicos dos vegetais. Além disso, favorecem o bom desempenho dos processos vitais da planta e permitem a obtenção de melhores produtividades (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Segundo Silva et al. (2008), os biorreguladores podem ser aplicados de variadas formas, por exemplo, via sementes, no solo ou na própria planta, tendo em qualquer dos métodos de aplicação o mesmo objetivo: incrementar a

produção, em função de processos ligados ao enraizamento, desenvolvimento vegetativo, floração e frutificação, pela aplicação dos hormônios.

As citocininas participam efetivamente dos processos de divisão e diferenciação celular, assim como atuam em associações com as auxinas e estrigolactonas (BREWER, 2009). A primeira citocinina natural extraída foi a zeatina, a mais ativa (principal representante) e seu precursor é purínico, como a base adenina, e não purínico (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dentre os processos regulados pela citocinina destacam-se: divisão celular e formação de órgãos, germinação de sementes, iniciação de crescimento radicular, desenvolvimento de gemas e brotações e retardamento da senescência. Nesse último caso, em folhas maduras há rápida decomposição de proteínas e degradação de cloroplasto, resultando em perda de clorofila, lipídeos e componentes dos ácidos nucleicos.

Em contrapartida, o ácido indol-3-acético (AIA) é a forma natural das auxinas e seu transporte em órgãos aéreos é polar, e se faz do ápice para a base (basípeta). São encontrados nos tecidos meristemáticos de diferentes órgãos, tais como, extremidades da raiz e flores ou inflorescências de ramos florais em crescimento, gemas em brotamento e folhas jovens. São hormônios endógenos com grande diversidade de efeitos fisiológicos sobre os vegetais, no qual baixos níveis de auxina são necessários para o alongamento da raiz, ao passo que, em altas concentrações, inibem o crescimento desse órgão (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Dentre os efeitos fisiológicos estão: alongação celular, relacionado com crescimento em tamanho da célula não meristemática, caracterizado por aumento de seu volume, que pode ocorrer por expansão ou por alongamento, e ocorre em uma única direção, como por exemplo, em comprimento; divisão celular associada ao alongamento celular; diferenciação celular do floema e do xilema; fototropismo; geotropismo; dominância apical; iniciação e alongação radicular; produção de etileno; crescimento de frutos; abscisão, em que altas concentrações de auxinas impedem a abscisão, evitando a queda de folhas e frutos; e partenocarpia (MERCIER, 2008).

As giberelinas constituem uma família com mais de 137 compostos, alguns somente encontrados no fungo *Giberella fujikuroi* e são caracterizadas como diterpenos (terpenóides), assemelhadas ao ácido giberélico.

As giberelinas apresentam papel essencial em muitos aspectos do desenvolvimento da planta, como germinação, alongamento dos entrenós e desenvolvimento de flores e frutos (VICHATO et al., 2007). São sintetizadas nas regiões de crescimento, sementes em germinação, frutos imaturos, ápices de caules e raízes (CASTRO et al., 2005).

Os principais eventos fisiológicos que as giberelinas estão relacionadas são os seguintes: quebra da dormência de gemas e sementes, no qual podem acelerar a germinação de sementes que requerem luz ou frio para superação da dormência; partenocarpia com a indução a formação de frutos sem o processo normal de fecundação; indução floral, no qual as giberelinas podem substituir os efeitos mediados pelo fotoperíodo e pelas baixas temperaturas na indução floral de algumas plantas; expressão sexual, em que em algumas espécies a aplicação pode resultar no aumento da produção de flores masculinas; atraso na senescência, podendo auxiliar na retenção da clorofila; alongamento do caule, no qual o sinergismo entre as giberelinas e a auxina promove a expansão/alongamento celular por exercerem efeito sobre a parede celular, sugerindo que as giberelinas sejam promotoras de alongamento celular, preferencialmente, em células jovens, ao passo que as auxinas seriam as principais promotoras da expansão celular em regiões em maturação (LARCHER, 2000; GUERRA; RODRIGUES, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os redutores que atuam sobre a estatura de plantas são, normalmente, antagonistas às giberelinas e agem modificando o metabolismo destas. Espindula et al. (2010a) e Espindula et al. (2005) apresentaram resultados promissores na redução da estatura das plantas de trigo com aplicação de trinexapac-etil.

Outro elemento, não menos importante, é o etileno, composto orgânico simples, que junto com os jasmonatos são os únicos fitormônios gasosos (transporte por difusão) que participam da regulação dos processos fisiológicos das plantas. Segundo Larcher (2000), o etileno é produzido em quase todas as células das plantas superiores a partir da metionina, em praticamente todos os órgãos. Difunde-se na fase gasosa por meio dos espaços intercelulares, podendo ser perdido para a atmosfera externa ou atingir outros órgãos da planta. Age em concentrações muito baixas e participa da regulação de

praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A produção de etileno aumenta em órgãos injuriados, folhas e flores cortadas, gemas dormentes, como também durante a senescência e abscisão de tecidos foliares e florais.

Em relação ao ácido abscísico (ABA), a biossíntese ocorre nos cloroplastos e em outros plastídeos, em sementes e folhas maduras, especialmente em resposta ao estresse hídrico. O transporte, na maioria das vezes, ocorre nas folhas pelo floema, cujo precursor é o ácido mevalônico, o mesmo das giberelinas, sendo considerado um dos mais frequentes inibidores naturais de sementes (LARCHER, 2000; SANTOS et al., 2002).

O ABA é um regulador de crescimento de plantas que pode estar envolvido no controle de muitos processos fisiológicos, tais como a abertura de estômatos, a síntese de proteínas de estoque das sementes, a inibição da germinação de embriões imaturos, o estresse hídrico e a tolerância ao déficit hídrico. Enquanto algumas dessas respostas ao ABA podem ser rápidas, em questão de minutos, como é o caso do fechamento de estômatos, por exemplo, outras podem ser mais demoradas e são conhecidas por requererem mudanças na expressão gênica. Entretanto, dos mecanismos de percepção de sinal hormonal, a rota de transdução ainda permanece obscura em muitos aspectos (SATO et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Com isso, é necessário manter o equilíbrio hormonal adequado em todos os estádios de crescimento para torná-las mais resistentes ao estresse e facilitar a expressão do seu potencial genético em termos de maior produtividade e qualidade (RAVEN et al., 2001).

Desta forma, são necessários estudos que confirmem os efeitos relatados para o produto e que resultem na adaptação e recomendação desta tecnologia para o sistema de produção do milho.

2.6 Biorregulador vegetal

Os eventos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento que ocorrem nos vegetais representam um processo integrado e complexo. No entanto, com o intuito de elevar os níveis de produtividade do milho, vêm sendo

desenvolvidas, como por exemplo, pesquisas com reguladores de crescimento e hormônios associados a nutrientes com o objetivo de acelerar o desenvolvimento das plantas, no qual resultariam em acréscimo na produção. Todavia, o emprego de biorreguladores é uma ferramenta agrônômica que pode incrementar a produtividade em diversas culturas; porém, há poucos estudos sobre esse assunto na cultura do milho (LANA et al., 2009; DOURADO NETO et al., 2004).

O biorregulador vegetal, também chamado de bioestimulante ou regulador vegetal, vem sendo utilizado tanto no tratamento de sementes quanto em pulverização foliar ou em frutos, com resultados agrônômicos positivos, em diferentes culturas, tais como: soja (KLAHOLD et al., 2006; ÁVILA et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; MOTERLE et al., 2008; ALBRECHT et al., 2010; ALBRECHT et al., 2011; ALBRECHT et al., 2012), algodão (SANTOS; VIEIRA, 2005; ALBRECHT et al., 2009), trigo (BERTI et al., 2007; PICCININ et al., 2013), maracujá amarelo (ECHER et al., 2006), videira (TECCHIO et al., 2006), assim como para milho (MILLÉO et al., 2000; DOURADO NETO et al., 2004; FERREIRA et al., 2007), entre outras.

Os hormônios e seus análogos sintéticos, os reguladores de crescimento e/ou biorreguladores, participam na regulação de muitos processos do vegetal, incluindo a divisão celular, morfogênese, alongamento, biossíntese de compostos e senescência (SANCHES, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Bewley e Black (1994) verificaram que os biorreguladores também estão envolvidos em vários processos durante o desenvolvimento das sementes, como no crescimento e desenvolvimento destas, nos tecidos extra-seminais, na acumulação e no armazenamento de reservas e diversos efeitos fisiológicos em tecidos e órgãos.

O biorregulador tem em sua concentração de 90 mg L⁻¹ de cinetina (citocinina), 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico - GA₃ (giberelina) e 50 mg L⁻¹ de ácido 4-indol-3-ilbutírico - IBA, sendo eles análogos sintéticos de hormônios vegetais, que atuam como mediadores de processos morfológicos e fisiológicos. Acredita-se que este biorregulador pode, em função da sua composição, concentração e proporção de substâncias, incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimular a divisão celular, podendo

também, aumentar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (VIEIRA; CASTRO, 2002).

Esse crescimento é conhecido como efeito fitotônico, que é caracterizado pelas vantagens positivas no crescimento e no desenvolvimento das plantas, proporcionadas pela aplicação de algum ingrediente ativo (CASTRO et al., 2008).

Quando as plantas são submetidas à aplicação de produtos à base de biorreguladores ou de bioestimulantes há melhoria na resistência das plantas ao estresse hídrico (ZHANG; ERVIN, 2004). Em função da aplicação do biorregulador, de maneira geral, ocorre um aumento nos níveis das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), bem como melhoria na eficiência fotoquímica (ZHANG; SCHMIDT, 1999; RICHARDSON et al., 2004). Dessa forma, a atividade antioxidante e a tolerância ao estresse têm sido observadas na cultura do milho (MALAN et al., 1990). Assim como a eficiência fotoquímica nas plantas com a aplicação de bioestimulantes e/ou biorreguladores (RICHARDSON et al., 2004). Além dessas vantagens, Klahold et al. (2006) constataram que a aplicação de biorregulador proporcionou incremento no número de vagens, no número de grãos e na produção por planta, na cultura da soja.

Moterle et al. (2011) utilizou doses crescentes de biorregulador que não influenciaram na germinação das sementes e no acúmulo de biomassa seca das plântulas. Apesar disso, aumentou a velocidade de germinação em sementes de soja. Ferreira et al. (2007), em manejo como bioestimulante Stimulate[®], não obteve incrementos na produtividade de grãos de milho híbrido e linhagem. Por outro lado, Ávila et al. (2008) e Albrecht (2010) obtiveram resultados positivos na qualidade das sementes de soja produzidas sob manejo com biorregulador.

Nessa mesma linha, Albrecht et al. (2011), no manejo da cultura da soja com o biorregulador Stimulate[®], na dose de 339,68 mL ha⁻¹, obtiveram maior número de vagens por planta e, em decorrência, aumento na produtividade. Ainda em seus estudos, Albrecht et al. (2012), ao aplicar 286,25 mL ha⁻¹ de Stimulate[®] na soja no estágio V₅, observaram alterações nos conteúdos de óleo e proteínas, com possibilidade de incremento no conteúdo protéico das sementes.

Bertolin et al. (2010) e Ávila et al. (2010) relataram que a ação do biorregulador pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais. No entanto, Baldo et al. (2009) verificaram que o uso do bioestimulante, na cultura do algodoeiro, não proporcionou melhoria no desenvolvimento das plantas, quando submetidas a deficiência hídrica.

Em relação à cultura do trigo, com a aplicação de bioestimulante (90 mg L⁻¹ de cinetina + 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico + 50 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico) e *Azospirillum brasilense*, isolado ou em associação, proporcionaram incrementos no desenvolvimento inicial de plântulas de trigo (RAMPIM et al., 2012).

Braccini et al. (2012), trabalhando com o tratamento de sementes com *Azospirillum brasilense* (200 mL ha⁻¹) e aplicação de 250 mL ha⁻¹ de Stimulate[®] em V₄, obtiveram resultados positivos nas características agrônômicas da cultura do milho.

Contudo, os resultados de pesquisas são contraditórios. A utilização do bioestimulante Stimulate[®] em sementes de algodão não afetou a germinação e emergência de plântulas (BELMONTE et al., 2003). A sua utilização em feijão, soja e arroz apresentou efeito positivo (VIEIRA, 2001; VIEIRA e CASTRO, 2000; ALBRECHT et al., 2010; ALBRECHT et al., 2011).

Dentre as tecnologias mais promissoras para atuarem nessa fase da cultura, destaca-se a utilização de reguladores de crescimento, que torna as plantas mais tolerantes a fatores de estresse e, conseqüentemente, podem se desenvolver mais vigorosamente em condições subótimas, permitindo melhores chances de atingir seu potencial genético de produtividade (CASTRO et al., 2008).

Considerando que o crescimento e desenvolvimento das plantas são regulados por uma série de hormônios vegetais, cujas biossíntese e degradação são produzidas em resposta a uma complexa interação de fatores fisiológicos, metabólicos e ambientais (DARIO et al., 2005). A introdução de análogos desses hormônios promotores pode influenciar, condicionar, estimular e potencializar o desempenho agrônômico, bem como melhorar o potencial fisiológico das sementes de milho.

2.7 Potencial fisiológico das sementes

A utilização de sementes de alta qualidade é imprescindível para o estabelecimento adequado da cultura do milho e fundamental para obter produtividade elevada, quando exposta a diferentes condições ambientais. No entanto, durante a produção das sementes, várias estratégias são adotadas para garantir melhor qualidade das sementes. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de sementes de alta qualidade fisiológica e elevado potencial de armazenamento têm sido prioridade em muitas pesquisas (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

Por isso, a obtenção de sementes de elevada qualidade fisiológica representa meta prioritária no processo de produção de qualquer cultura, uma vez que a germinação e a emergência das plântulas são reflexos dessa qualidade.

O vigor das sementes é definido como "propriedades de sementes que determinam o potencial para a emergência rápida e uniforme e o desenvolvimento de plântulas, sob uma ampla gama de condições" (AOSA, 2002). Geralmente, a baixa germinação e alta sensibilidade ao estresse das sementes e mudas, durante o processo de germinação, bem como plantas com crescimento lento, irregular ou com menor desenvolvimento do sistema radicular, são características típicas de sementes com baixo potencial fisiológico (MARCOS-FILHO, 2005).

Qualidade da semente é a soma de diversos atributos que contribuem para obtenção de plântulas mais vigorosas, que apresentam rápida emergência no campo, além de proporcionar crescimento das plantas e florescimento mais uniforme, possibilitando, assim, garantia de produção em termos quantitativos e qualitativos. Entre esses atributos encontram-se aqueles de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (POPINIGIS, 1985).

A deterioração das sementes, processo inevitável, cuja intensidade e velocidade variam em função de suas características morfológicas e fisiológicas, deve ser retardada ao máximo, por meio de práticas adequadas de manejo como adubação nitrogenada e aplicação de biorregulador, possibilitando a comercialização de sementes com potencial fisiológico mais

próximo possível do alcançado na época da maturidade fisiológica (MARCOS-FILHO, 2005).

Por outro lado, as sementes adquirem a máxima qualidade próxima à maturidade fisiológica, período em que ocorre o máximo acúmulo de matéria seca, a fim de promover formação completa dos sistemas bioquímico, morfológico e estrutural (NAKADA et al., 2011). A rapidez com que ocorre a perda de qualidade das sementes após a maturidade fisiológica é em função da espécie, da cultivar e das condições impostas às sementes no campo, após a colheita e durante as operações de beneficiamento e armazenamento (MARCANDALLI et al., 2011).

De certa forma, o N pode influenciar a qualidade das sementes de diversas culturas e os seus efeitos variam conforme as condições ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta, em que a aplicação é realizada, refletindo principalmente no tamanho e na massa das sementes, na formação do embrião, com reflexos na viabilidade e no vigor das sementes (MARCOS-FILHO, 2005, MEIRELES et al., 2009; TOLEDO et al., 2009; ABRANTES et al., 2010). A adubação nitrogenada influencia não só a produtividade, mas também a qualidade do produto, em consequência do aumento no conteúdo de proteína nas sementes, as quais são constituintes importantes no desenvolvimento do embrião (LANDRY; DELYE, 1993; FERREIRA et al., 2001).

Avaliando materiais genéticos, doses e épocas de aplicação de nitrogênio, Silva et al. (2005) concluíram que a resposta da produtividade à cobertura nitrogenada tardia diferiu entre as cultivares de milho.

Gondim et al. (2006), avaliando o efeito de diferentes níveis de nitrogênio no cultivo de variedades de milho sobre a qualidade fisiológica das sementes, observaram que as sementes de todas as variedades analisadas apresentaram elevada qualidade fisiológica, quando cultivadas em altos níveis de nitrogênio.

Por outro lado, Zucarelli et al. (2012) trabalhando com doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura de milho doce, observaram que a massa de sementes e a germinação das sementes de milho doce não foram influenciadas pelas doses e épocas.

Acredita-se que os biorreguladores podem incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimular a divisão celular, podendo, também,

umentar a absorção de água e de nutrientes pelas plantas (VIEIRA; CASTRO, 2002) e melhorar a qualidade fisiológica da semente (ALBRECHT et al., 2010).

No entanto, além do acúmulo de substâncias de reservas, o desenvolvimento das sementes é caracterizado pela formação de inúmeros compostos químicos importantes, dentre eles os hormônios que estão envolvidos em diversos processos, tais como: período de repouso pré-maturidade, acúmulo de reservas, desenvolvimento de tecidos externos à semente (frutos) e armazenamento de reservas para o uso posterior durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula.

As sementes, no início do desenvolvimento, apresentam quantidades significativas de citocininas, auxinas, ácido abscísico e giberelinas. As citocininas estão associadas principalmente à fase inicial de desenvolvimento da semente. Os teores crescem acentuadamente logo após a fecundação e diminuem à medida que as sementes acumulam matéria seca. As auxinas atuam no início do desenvolvimento das sementes e podem ser responsáveis por atividades de assimilação de compostos provenientes da planta-mãe. As giberelinas, em diferentes formas e quantidades, estão diretamente associadas à expansão celular e ao direcionamento da síntese de reservas. Juntamente com as auxinas atuam no crescimento das paredes do ovário (MARCOS-FILHO, 2005).

Assim, Milléo (2000), trabalhando com Stimulate[®], aplicado nas sementes e no sulco de semeadura na cultura do milho, obteve resultados satisfatórios como maior velocidade na emergência, maior produção de massa seca, maior número de fileiras de grãos por espiga e maior produção de grãos.

Silva et al. (2008), tratando sementes de milho com Stimulate[®], verificaram redução de 38% na germinação. Ferreira et al. (2007) não observaram diferença na germinação das sementes de híbrido simples de milho, quando as sementes foram tratadas com Stimulate[®]. Campos et al. (2008, 2009), trabalhando com o mesmo produto ou com outros reguladores, verificaram que além de alterar o desempenho agrônomo da soja, proporcionou a produção de sementes com diferenciado potencial fisiológico e menor incidência de patógenos.

A incorporação desses novos avanços proporcionados pela pesquisa, como técnicas modernas (fisiológicas, bioquímicas e moleculares), representa

a base para o entendimento e a integração de mecanismos múltiplos que conduzem à produção de sementes de alta qualidade, melhorando o estabelecimento inicial das plantas no campo (estande) e, conseqüentemente, permitindo maior produtividade agrícola.

Diante do exposto, considerando-se a importância econômica da cultura do milho e a escassez de informações na literatura, principalmente relacionada ao manejo com biorregulador, associado à adubação nitrogenada, a adoção desta prática agrônômica pode ser uma estratégia importante no sentido de minimizar possíveis estresses e contribuir para a produção de sementes com maior potencial fisiológico.

3. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, F. L.; KULCZYNSKI, S. M.; SORATTO, R. P.; BARBOSA, M. M. M. Nitrogênio em cobertura e qualidade fisiológica e sanitária de sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 106-115, 2010.
- ABBSI, M. K.; SHARIF, S.; KAZMI, M.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**, v. 145, n. 1, p. 159-168, 2011.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. **Annals Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 735-745, 2010.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea-*Rhizobium* symbiosis. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 2, p. 266-272, 2011a.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. **Journal Pest Science**, v. 84, n. 1, p. 123-131, 2011b.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Plant growth promoting fungicide tolerant *Rhizobium* improves growth and symbiotic characteristics of lentil (*Lens esculentus*) in fungicide-applied soil. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 3, p. 334-342, 2011c.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 245-254, 2012.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; ÁVILA, M. R.; BARBOSA, M. C.; RICCI, T. T.; ALBRECHT, A. J. P. Aplicação de biorregulador na produtividade do algodoeiro e qualidade de fibra. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 191-198, 2009.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. J. P.; BARBOSA, M. C. Qualidade das sementes de soja produzidas sob manejo com biorregulador. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 39-48, 2010.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. J. P.; RICCI, T. T. Manejo de biorregulador nos componentes de produção e desempenho das plantas de soja. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 6, p. 865-876, 2011.

ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. Biorregulador na composição química e na produtividade de grãos de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 774-782, 2012.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J. Estimativa da adubação nitrogenada para milho em sistemas de manejo e culturas de cobertura do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 3, p. 553-570, 2000.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 241-248, 2002.

AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 467-473, 2005.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, ed. Especial, p. 1643-1651, 2003.

ARAÚJO, L. A. N.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.

A.O.S.A - Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Stillwater, 2002. (Contribution, 32).

ÁVILA, M. R.; BARIZÃO, D. A. O.; GOMES, E. P.; FEDRI, G.; ALBRECHT, L. P. Cultivo de feijoeiro no outono/inverno associado à aplicação de bioestimulante e adubo foliar na presença e ausência de irrigação. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 3, p. 221-230, 2010.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ALBRECHT, L. P.; TONIN, T. A.; STÜLP, M. Bioregulator application, agronomic efficiency, and quality of soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 6, p. 567-691, 2008.

BALDO, R.; SCALON, S. P. Q.; ROSA, Y. B. C. J.; MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; BARRETO, W. S. Comportamento do algodoeiro cultivar delta opal sob estresse hídrico com e sem aplicação de bioestimulante. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, Edição especial, p. 1804-1812, 2009.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J. P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279-285, 2006.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, (Issue null), p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BASHAN, Y., LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 591-608, 1990.

BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 69-75, 1993.

BELMONT **Ação de fitorregulador de crescimento na germinação de sementes de algodoeiro**. Areia: Centro de Ciências Agrárias/UFPB, 2003. 48p. (Relatório de Pesquisa).

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; COMIRAN, F. BERGONCI, J. I.; MÜLLER, A. G.; FRANÇA, S.; SANTOS, A. O.; RADIN, B.; BIANCHI, C. A. M.; PEREIRA, P. G. Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 243-249, 2006.

BERGAMASCHI, H.; RADIN, B.; ROSA, L. M. G.; BERGONCI, J. I.; ARAGONÉS, R.; SANTOS, A. O.; FRANÇA, S.. Estimating maize water requirements using agrometeorological data. **Revista Argentina de Agrometeorologia**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2001.

BERGAMASCHI, H.; WHEELER, T. R.; CHALLINOR, A. J. COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Rendimento de milho e chuva em diferentes escalas espaço-temporais no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 603-613, 2007.

BERLATO, M. A.; MATZENAUER, R. Teste de um modelo de estimativa do espigamento do milho com base na temperatura do ar. **Agronomia Sulriograndense**, v. 22, n. 1, p. 243-259. 1986.

BERTI, M.; ZAGONEL, J.; FERNANDES, E. C. Produtividade de cultivares de trigo em função do trinexapac-ethyl e doses de nitrogênio. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 2007.

BERTOLIN, D. C.; SÁ, M. E.; ARF, O.; FURLANI JUNIOR, E.; COLOMBO, A. S.; CARVALHO, F. L. B. M. Aumento da produtividade de soja com a aplicação de bioestimulantes. **Bragantia**, v. 69, n. 2, p. 339-347, 2010.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BISSANI, C. A.; GIANELO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. Nitrogênio e Adubos nitrogenados. In: BISSANI, C. A.; GIANELO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. (Ed.) **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.145-168.

BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.

BODDEY, R. M. J.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.

BORGES, E. A. FERNANDES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E. E.; SOUZA, S. R.; Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Caatinga**, v. 19, n. 3, p. 278-286, 2006.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crops Research**, v. 11, p. 131-139, 1985.

BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BREWER, P.; DUN, E.; FERGUSON, B.; RAMEAU, C.; BEVERIDGE, C. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 482-493, 2009.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 53-63, 2008.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 74-79, 2009.

CARDOSO, S. M.; SORATTO, R. P.; SILVA, A. H.; MENDONÇA, C. G. Fontes e parcelamento do nitrogênio em cobertura, na cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 1, p.23-28, 2011.

CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CASTRO, G. S. A.; BOGIANI, J. C.; SILVA, M. G.; GAZOLA, E.; ROSOLEM, C. A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1311-1318, 2008.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. Hormônios e reguladores vegetais. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. cap. 11, p. 389-440.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132 p.

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

CERETTA, C. A.; FRIES, M. B. Adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. In: NUERNBERG, N. J. **Plantio direto: conceitos, fundamentos e práticas culturais**. Lages: SBCS – Núcleo Regional Sul, 1997. p. 111-120.

COELHO, A. M. **Nutrição e adubação do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2006. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 45).

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Sétimo Levantamento**, abril 2015. Brasília, 2015. 100 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_10_09_22_05_bol_etim_graos_abril_2015.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2015.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 859-868, 1995.

CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; ALVARENGA, R. C.; NETO, M. M. G.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F.; SANTANA, D. P. **Manejo da cultura do Milho**, Circular Técnica 87, Sete Lagoas, MG, dez. 2006.

DARIO, G. J. A.; MARTIN, T. N.; DOURADO NETO, D.; MANFRON, P. A.; BONNECARRERE, R. A. G.; CRESPO, P. E. N. Influência do uso de fitorreguladores no crescimento da soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 12, n. 1, p. 63-70, 2005.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*

parooensis sp. nov. **Systems Applied to Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 1997.

DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum* plant association. **Critical Reviews in Plant Science**, p. 57-75, 1994.

DETOMINI, E. R.; MASSIGNAN, F. D. M.; LIBARDI, P. L.; DOURADO NETO, D. Consumo hídrico e coeficiente de cultura para o híbrido DKB 390 rido DKB 390. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 445-452, 2009.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 9, p. 645-651, 1996.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDEBROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 155-164, 1999.

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

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JR., P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; GARCIA, R. A. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 161-171, 2008.

ECHER, M. M.; GUIMARÃES, V. F.; KRIESER, C. R.; ABUCARMA, V. M.; KLEIN, J.; SANTOS, L.; DALLABRIDA, W. R. Uso de bioestimulante na formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 351-360, 2006.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KI HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001.

EHLERINGER, J. R.; CERLING, E.T.; HELLIKER, B. R. C4 photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. **Oecologia**, Berlin, v. 12, n. 112, p. 285-299, 1997.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Diagnóstico dos Problemas e Potencialidades da Cadeia Produtiva do Milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. (Documentos 168).

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp245**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2003. (Comunicado Técnico, 69).

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p.

ESPINDULA, M. C.; ROCHA, V. S.; SOUZA, L. T.; SOUZA, M. A.; GROSSI, J. A. S. Efeitos de reguladores de crescimento na elongação do colmo de trigo. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

ESPINDULA, M. C.; CAMPANHARO, M.; ROCHA, V. S.; MONNERAT, P. H.; FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v. 88, n. 1, p. 97-185, 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistic Database** – FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 13 abril. 2015.

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

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p.131-138, 2001.

FERREIRA, L. A.; OLIVEIRA, J. A.; VON PINHO, É. V. R.; QUEIROZ, D. L. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 80-89, 2007.

FISCHER, S. E, FISCHER, S. I.; MAGRIS, S.; MORI, G. B. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 895-903, 2007.

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

FORSTHOFER, E. L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; MINETTO, T.; RAMBO, L.; ARGENTA, G.; SANGOI, L.; SUHRE, E.; SILVA, A. A. **Desempenho agrônômico e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura**. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v. 41, n. 3, p. 399-407, 2006.

GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Studies of nitrate uptake in barley. IV Electrophysiology. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 456-463, 1992.

GOMES, R. F.; SILVA, A. G.; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 5, p. 931-938, 2007.

GONDIM, T. C. O.; ROCHA, V. S.; SANTOS, M. M.; MIRANDA, G. V. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho crioulo sob estresse causado por baixo nível de nitrogênio. **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 413-417, 2006.

GUERRA, M. P.; RODRIGUES, M. A. Giberelinas. In: KERBAURY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. cap. 11, p. 235-254.

HADAS, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedlings. **Biology Fertility Soils**, v. 5, n. 4, p.241–247, 1987.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2006.

HANWAY, J. J. Growth stages of corn (*Zea mays*). **Agronomy Journal**, Madison, v. 55, n. 5, p. 487-492, 1963.

HATTERSLEY, P. W. Characterization of C4 type leaf anatomy in grasses (Poaceae). Mesophyll: bundles sheath area ratios. **Annual of Botany**, Londres, v. 53, n. 2, p.163-179, 1984.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. (Documentos, 325). 37p.

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 explored. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1229-1244, 2004.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and **Research in Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 679-694, 1989.

KINIRY, J. R. XIE, Y.; GERIK, T. J.; Similarity of maize seed number responses for a diverse set of sites. **Agronomie**, v. 22, n. 3, p. 265-272, 2002.

KLAHOLD, C. A.; GUIMARÃES, V. F.; ECHER, M. M.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R. L.; BECKER, A. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 179-185, 2006.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades: série sementes. Londrina: **Embrapa Soja**, 2008. 8 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 55).

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERELEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LANA, A. M. Q.; LANA, R. N. Q.; GOSUEN, C. F.; BONOTTO, I.; TREVISAN, L. R. Aplicação de reguladores de crescimento na cultura do feijoeiro. **BioScience Journal**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. L. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.

LANDRY, J.; DELYE, S. The Tryptophan contents of wheat, maize and barley grains as a function of nitrogen content. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 3, p. 259-266, 1993.

LARSSON, C. M.; INGEMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: WRAY, J. L.; KINGHORN, J. R. (Ed.). **Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation**. Oxford: Oxford Science, 1989. cap. 1, p. 3-14.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000.

LAVRINENKO K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2832-2833, 2010.

LIN, C. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 761-765, 2009.

LOPES, S. A.; WIETHÖLTER, S.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A. **Sistema plantio direto**: bases para o manejo da fertilidade do solo. São Paulo: ANDA, 2004. 110 p.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. **Chemosphere**, v. 75, n. 6, p. 719-725, 2009.

MAIA, M. C. C.; SILVA, P. S. L. Parcelamento da adubação nitrogenada e matéria seca no milho. **Caatinga**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2001.

MALAN, C.; GREYLING, M. M.; GRESSEL, J. Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. **Plant Science**, v. 69, n. 2, p. 157-166, 1990.

MALUF, J. R. T.; CUNHA, G. R.; EVANGELISTA, B. A. Zoneamento: períodos de semeadura. Safra 2000/2001. In: Indicações técnicas para a cultura de milho no estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Fepagro, **Embrapa Trigo**, Emater/RS, Fecoagro/RS, 2001. 135p. (Boletim Técnico, 7).

MAR, G. D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; NOVELINO, J. O. Produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 267-274, 2003.

MARCANDALLI, L. H.; LAZARINI, E.; MALASPINA, I. C. Épocas de aplicação de dessecantes na cultura da soja: qualidade fisiológica das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 241-250, 2011.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565-572, 2004.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2805-2809, 2007b.

MEHNAZ, S.; KOWALIK, T.; REYNOLDS, B.; LAZAROVITZ, G. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, 2010.

MEIRELES, R. C.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F.; REIS, L. S.; LYRA, G. B.; MARINHO, A. B. Influência do nitrogênio e das lâminas de irrigação na qualidade fisiológica das sementes de mamoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 216-221, 2009.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Coord). **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.182-211.

MILLÉO, M. V. R.; VENÂNCIO, W. S.; MONFERDINI, M. A. Avaliação da eficiência agrônômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 67, (Supl.), p. 1-145, 2000.

MIRANDA, C. H. B.; BODDEY, R. M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in ¹⁵N labelled soil. **Agronomy Journal**, v. 79, n. 3, p. 558-563, 1987.

MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; BARBOSA, M. C. Efeito da aplicação de biorregulador no desempenho agrônômico e produtividade da soja. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, supl. esp., p. 701-709, 2008.

MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; BONATO, C. M.; CONRADO, T. Efeito de biorregulador na germinação e no vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, v. 58, n. 5, p. 651-660, 2011.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C.; GOMES, L. A. A; PINHO, E. V. R. V. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos referentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.

OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 345-365, 1985.

OAKS, A. Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. **Plant Physiology**, v. 106, n. 2, p. 407-414, 1994.

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

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

OKUMURA, R. S.; TAKAHASHI, H. W.; SANTOS, D. G. C.; LOBATO, A. K. S.; MARIANO, D. C.; MARQUES, O. J.; SILVA, M. H. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; LIMA JUNIOR, J. A. Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 3-4, p. 510-514, 2011.

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; LANA U. G. P.; SCOTTI M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana na rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência do uso do fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1473-1482, 2009.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1263-1271, 2006.

PEREIRA FILHO, I. A. **O cultivo do milho-verde**. Brasília: Embrapa, 2003.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143-1150, 2007.

PICCININ, G. G.; DAN, L. G. M.; BRACCINI, A. L.; MARIANO, D.C.; OKUMURA, R. S.; BAZO, G.; RICCI, T. T. Agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* in physiological parameters and yield components in wheat crop. **Journal of Agronomy**, v. 10, n. 4, p.132-135, 2011.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; SCAPIM, C. A.; RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

POMMEL, B.; MOURAUX, D.; CAPPELLEN, O.; LEDENT, J. F. Influence of delayed emergence and canopy skips on the growth and development of maize plants: a plant scale approach with CERES-Maize. **European Journal Agronomy**, v. 16, n. 4, p. 263-277, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2º ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

RADIN, B.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A. O.; BEGONCI, J. I.; FRANÇA, S.. Evapotranspiração da cultura do milho em função da demanda evaporativa atmosférica e do crescimento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 9, n. 1-2, p. 7-16, 2003.

RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

RAMPIM, L.; COSTA, A. C. P. R.; NACKE, H.; KLEIN, J.; GUIMARÃES, V. F. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 678-685, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (Ed.). **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 646-675.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 43-51, 1987.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

RIBAUT, J. M.; PILET, P. E. Effects of water stress on growth, osmotic potential and abscisic acid content of maize roots. **Physiologia Plantarum**, v. 81, n. 2, p. 156-162, 1991.

RICHARDSON, A. D.; AIKENS, M.; BERLYN, G. P.; MARSHALL, P. Drought stress and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings: effects of an organic biostimulant on plant health and stress tolerance, and detection of stress effects with instrument-based, noninvasive methods. **Journal of Arboriculture**, v. 30, n. 1, p. 52-61, 2004.

RITCHIE, J. T.; D. S.; NeSMITH, Temperature and Crop Development. In: Modeling Plant and Soil Systems. **Hanks and Ritchie** (Eds.). ASA, CSSSA, SSSA, Madison, WI. 1991. 289p.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26 p.

RODRIGUEZ, O.; DIDONET, A. D.; Milho: efeito da temperatura na duração da taxa de crescimento de grãos. **Embrapa trigo**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n.15, 2003.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SA, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1201-1204, 2005.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V.; SANGEETA, K.; SAMITHA, A. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). **Current Science**, v. 93, n. 1, p. 1296-1300, 2007.

SANTOS, C. M. G.; VIEIRA, E. L. Efeito de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento inicial do algodoeiro. **Magistra**, v. 17, n. 3, p. 124-130, 2005.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences Medicine Research**, v. 2011, n. 21, p. 1-30, 2011.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C.; Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 3, p. 215-225, 2008.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertilizer Soils**, v. 21, n. 3, p. 193-196, 1996.

SANCHES, F. R. **Aplicação de biorreguladores vegetais: aspectos fisiológicos e aplicações práticas na citricultura mundial**. Jaboticabal: Funep, 2000. 160 p.

SANTOS, C. H.; DOMINGUES, C. S. Mecanismo de ação de auxinas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 35-48.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, 2001.

SILVA, E. D.; BUZETTI, S.; LAZARINI, E. Aspectos econômicos da adubação nitrogenada na cultura do milho em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 3, p. 286-297, 2005.

SILVA, T. T. A.; PINHO, É. V. R. V.; CARDOSO, D. L.; FERREIRA, C. A.; ALVIN, P. O. Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 840-846, 2008.

SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, F. H. T.; SILVA, P. I. B. Efeitos da aplicação de doses de nitrogênio e densidades de plantio sobre os rendimentos de espigas verdes e de grãos de milho. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 452-455, 2003.

SILVA, P. S. L.; DUARTE, S. R.; OLIVEIRA, F. H. T.; SILVA, J. C. V. Effect of planting density on green ear yield of maize cultivars bred in different periods. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 154-158, 2007.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. IX – Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STORCK, L.; CARGNELUTTI, A. F.; LOPES, S. J.; TOEBE, M.; SILVEIRA, T. R. Duração do subperíodo semeadura-florescimento, crescimento e produtividade de grãos de milho em condições climáticas contrastantes. **Revista de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 1, p. 27-39, 2009.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, n. 1, p. 55-60, 1994.

SWEDRZYNSKA, D. Effect of Inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 9, n. 5, p. 423-428, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954 p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* ssp. and two species, *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TECCHIO, M. A.; LEONEL, S.; CAMILI, E. C.; MOREIRA, G. C.; PAIOLIPRES, E. J.; RODRIGUES, J. D. Uso de bioestimulante na videira niagara rosada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1236-1240, 2006.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CESAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARINI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

TOLLENAAR, M. T. B.; DAYNARD, R. B.; HUNTER. Effect of temperature and rate of leaf appearance and flowering date in maize. **Crop Science**. v. 19, p. 363-366, 1979.

TURPIN, D. H.; VANLERBERGHE, G. C.; AMORY, A. M.; GUY, R. D. The inorganic carbon requirements for nitrogen assimilation. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 5, p. 1139-1145, 1991.

USDA. **USDA Agricultural Projections to 2023**. Washington: Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee, 2014. 91p. (Long-term Projections Report OCE-2014-1). Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/publications/oce-usda-agriculturalprojections/oce141.aspx#.UyieO6hdWXE>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

VAMERALI, T.; SACCOMANI, M.; BONA, S.; MOSCA, G.; GUARISE, M.; GANIS, A. A. Comparison of root characteristics in relation to nutrient and water stress in two maize hybrids. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 157-167, 2003.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 16-20, 2007.

VIDAL, R. A.; SPADER, V.; LAMBERT, W. J.; BAUMAN, T. T.; MEROTTO, J. A.; FLECK, N. G. Análise comparativa da interferência de poáceas na cultura do milho nos EUA e no Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 182-184, 1999.

VIEIRA, E. L.; SANTOS, C. M. G. Efeito de bioestimulante no crescimento e desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro. **Magistra**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2005.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. **Ação de estimulante no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Piracicaba: USP/Depto. Ciências Biológicas, 2002. 3 p.

VIEIRA JUNIOR, P. A. Milho. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Ed.). **Ecofisiologia dos cultivos anuais**. São Paulo: Nobel, 1999. p. 41-72.

VIEIRA JÚNIOR, P. A.; MOLIN, J. P.; DOURADO NETO, D.; MANFRON, P. A.; MASCARIN, L. S.; FAULIN, G. C.; DETOMINI, E. R. População de plantas e alguns atributos do solo relacionados ao rendimento de grãos de milho. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 28, n. 4, p. 483-492, 2006.

VIEIRA JÚNIOR, P. A.; DOURADO NETO, D.; OLIVEIRA, R. F.; PERES, L. E. P.; MARTIN, T. N.; MANFRON, P. A.; BONNECARRÈRE, R. A. G. Relações entre o potencial e a temperatura da folha de plantas de milho e sorgo submetidas a estresse hídrico. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 555-561, 2007.

WANI, P. A., KHAN, M. S. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food Chemical, Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3262-3267, 2010.

WELCKER, C.; BOUSSUGE, B.; BENCIVENNI, C.; RIBAUT, M.; TARDIEU, F. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 339-349, 2007.

WENSUO, J. JIANHANA, Z.; DA-PENG, Z. Metabolism of xilem-delivered ABA in relation to ABA flux and concentration in leaves of maize and *Commelia communis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 301, p. 1085-1091, 1996.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 487-511, 2001.

WORDELL FILHO, J. A.; CASA, R. T. Situação e perspectivas socioeconômicas para o milho. In: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. (Ed.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2010. p. 25.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum ory* from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1435-1438, 2005.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of BURRIS, R. M.; EVANS, M. S. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Springer Verlag, 1992. 943 p.

ZHANG, X.; ERVIN, E. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. **Crop Science**, v. 44, n. 5, p. 1737-1745, 2004.

ZHANG, X.; SCHMIDT, R. E. Antioxidant response to hormone-containing product in Kentucky bluegrass subjected to drought. **Crop Science**, v. 39, n. 2, p. 545-551, 1999.

ZUCARELI, C.; PANOFF, B.; PORTUGAL, G.; FONSECA, I. C. B. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 480-487, 2012.

CAPÍTULO I

Desempenho agrônômico do milho em resposta à inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, associado a doses de nitrogênio e biorregulador

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, associado a doses de nitrogênio e biorregulador no desempenho agrônômico. Para tanto, o híbrido simples de milho Pioneer 30F35 YH foram conduzidos os experimentos nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012. Os tratamentos foram constituídos da ausência e presença da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* (0,0 e 200 mL ha⁻¹), cinco doses de adubação nitrogenada (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha⁻¹) e duas doses do biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos casualizados em esquema fatorial (2 x 5 x 2) com seis repetições. As características agrônômicas avaliadas foram as seguintes: altura de plantas, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, massa de mil grãos, produtividade e teor foliar de nitrogênio. Os dados foram submetidos à análise de variância conjunta e realizados os desdobramentos necessários das interações. O tratamento de sementes com inoculante não influenciou na altura de plantas e no número de fileiras de grãos. O uso do inoculante não substituiu totalmente as adubações nitrogenadas no milho. A interação entre a aplicação de 250 mL ha⁻¹ de biorregulador em V₄ e a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, não proporcionou incrementos significativos na produtividade. A inoculação com *Azospirillum brasilense* via sementes proporcionou incrementos de 11% na produtividade, seguido do incremento do número grãos por fileira e no teor foliar de nitrogênio. A inoculação das sementes de milho proporcionou retorno na ordem de R\$ 303,00 ha⁻¹.

Palavras-chave: *Zea mays* L., adubação nitrogenada, bactérias diazotróficas, rendimento.

CHAPTER I

Agronomic performance of corn in response to seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with nitrogen doses and bioregulator

The objective of the present work was to evaluate the effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen doses and bioregulator on agronomic performance. In order to do so, the experiments were conducted with the simple hybrid of corn Pioneer 30F35 YH in the agricultural years 2010/2011 and 2011/2012. Treatments were constituted in the absence and presence of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* (0.0 and 200 mL ha⁻¹), five nitrogen fertilization doses (0.0, 45, 90, 135 and 180 kg of N ha⁻¹) and two doses of bioregulator (0.0 and 250 mL ha⁻¹). The experimental design used was in randomized complete blocks in factorial scheme (2 x 5 x 2) with six replications. The agronomic characteristics evaluated were the following: plant height, number of grains rows per ear, number of grains per row, mass per thousand grains, yield and content of foliar content of N. Data were subjected to joint analysis of variance and the necessary outspreads of the interactions were performed. Seed treatment with inoculant did not influence the plant height and number of grain rows. The use of inoculant does not fully replace the nitrogen fertilization in corn. The interaction between the application of 250 mL ha⁻¹ of bioregulator in V₄ and the seed inoculation with *Azospirillum brasilense* did not provide significant increments in yield. Inoculation with *Azospirillum brasilense* in seeds provided increments of 11% in productivity, followed by the increase in grain number per row and leaf nitrogen content. Inoculation of corn seeds provide returns of R\$ 303.00 ha⁻¹.

Keywords: *Zea mays* L., nitrogen fertilization, diazotrophic bacteria, yield.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do milho no Brasil vem crescendo constantemente, principalmente na segunda safra ou “safrinha”. Esse aumento, tanto de área quanto nas produtividades médias alcançadas, é devido ao desenvolvimento constante de novas tecnologias e materiais genéticos adaptados às diversas condições edafoclimáticas do país.

Dentre as inovações tecnológicas desenvolvidas para a cultura do milho nos últimos anos, a fim de se diminuir o custo de produção e aumentar a produtividade de grãos, destaca-se o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, utilização de diferentes espaçamentos e arranjos de plantas, inoculação das sementes com a *Azospirillum brasilense*, diferentes formas de adubação, aplicação de biorreguladores, entre outras práticas (BRACCINI et al., 2012).

Neste sentido, o *Azospirillum brasilense*, quando inoculado via semente, incrementou a produtividade da cultura do trigo (BARBIERI et al., 1993; SWEDRZYNSKA, 2000; ROESCH et al., 2005; PICCININ, et al., 2011; PICCININ et al., 2013), do milho (CAVALLET et al., 2000; SAIKIA et al., 2007; REIS JUNIOR et al., 2008; MEHNAZ, et al., 2010; BRACCINI et al., 2012), proporcionando aumento no crescimento da parte aérea e da raiz das plântulas de arroz (EMBRAPA, 2003), milheto (BOUTON et al., 1985) e cana-de-açúcar (BODDEY, 1995).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) estão sendo usadas em todo o mundo como bioinoculantes para promover crescimento e desenvolvimento das plantas em diferentes ambientes sob estresses, como presença de metais pesados (MA et al., 2009; WANI E KHAN, 2010), herbicidas (AHEMAD; KHAN, 2011a; AHEMAD; KHAN, 2010), inseticidas (AHEMAD; KHAN, 2011b), fungicidas (AHEMAD; KHAN, 2012; AHEMAD; KHAN, 2011c), salinidade (MAYAK et al., de 2004), entre outras situações.

Essas BPCP's apresentam a capacidade de promover o crescimento de plantas por diferentes mecanismos, tais como: solubilização de fosfato; fixação biológica do nitrogênio (FBN) e aumento na atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas; bem como produção de

hormônios, como auxinas, citocininas, giberilinas (RODRIGUEZ et al., 2004; CASSÁN; GARCIA, 2008; TIEN et al., 1979; STRZELCZYK et al., 1994; BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

Hungria et al. (2010) relataram os efeitos do *Azospirillum* spp. sobre a cultura do milho, como aumento na produção de matéria seca, produção de grãos e acúmulo de nitrogênio em plantas inoculadas.

Atualmente, é crescente a preocupação do uso de fertilizantes nitrogenados, em função da poluição dos recursos hídricos e da atmosfera, em virtude do mesmo estar sujeito a perdas por erosão, lixiviação, volatilização e desnitrificação (FAGUEIRA; BALIGAR 2005; CARDOSO et al., 2011).

O nitrogênio é considerado um dos principais elementos limitadores da produtividade das culturas (DA ROS et al., 2003) e tem com única forma de armazenamento no solo a matéria orgânica. Segundo Moreira e Siqueira (2002), menos da metade do nitrogênio aplicado no solo é absorvido pelas plantas, o restante é imobilizado ou perdido por volatilização ou lixiviação.

Outro importante processo dirigido pela microbiota do solo é a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN). Moreira e Siqueira (2002) afirmaram que a fixação do N₂ atmosférico pela microbiota é a principal via de adição de N no sistema solo-planta, contribuindo com cerca de duas vezes mais do que é aplicado via fertilização mineral. As quantidades de N₂ fixadas pelo *Azospirillum* spp., em gramíneas são menores do que comparadas as leguminosas, no entanto, esta forma de fixação de nitrogênio é importante no âmbito de depender cada vez menos de fertilizantes nitrogenados (PUGNAIRE; VALLADARES, 2007).

O produto que tem em sua concentração de 90 mg L⁻¹ de cinetina (citocinina), 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico GA₃ (giberelina) e 50 mg L⁻¹ de ácido 4-indol-3-ilbutírico - IBA (auxina), sendo eles análogos sintéticos de hormônios vegetais. Atuam como mediadores de processos morfológicos e fisiológicos. Acredita-se que este biorregulador pode, em função da sua composição, concentração e proporção de substâncias, incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimular a divisão celular, podendo, também, aumentar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (VIEIRA; CASTRO, 2002).

Os biorreguladores ou reguladores vegetais podem ser utilizados no manejo alternativo em diversas culturas, tais como algodão (SANTOS; VIEIRA, 2005; VIEIRA; SANTOS, 2005; ALBRECHT et al., 2009), soja (MOTERLE et al., 2008; CAMPOS et al., 2009, ALBRECHT et al., 2012) e milho (MILLÉO et al., 2000; DOURADO NETO et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; BRACCINI et al., 2012).

Contudo, é válida a realização de pesquisas que contribuam com informações quanto à questão do uso de biorreguladores na cultura do milho, associado ao manejo de nitrogênio que envolva também alternativas como o uso de *Azospirillum* spp. via semente.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, associado a doses de nitrogênio e de biorregulador no desempenho agronômico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução dos experimentos

Os experimentos de campo foram instalados nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, região Noroeste do Estado do Paraná. A FEI encontra-se situada a uma latitude de 23°25' sul e longitude de 51°57' a oeste de Greenwich, com altitude média de 540 m.

O solo da área experimental é classificado como Argissolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999) textura argilosa, (argila: 520 g kg⁻¹; silte: 140 g kg⁻¹ e areia: 340 g kg⁻¹). Os resultados da análise química de material de solo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo na camada de 0 - 20 cm para o solo Argissolo Vermelho distroférico, antes da implantação da cultura

Profundidade (m)	P ¹ (mg dm ⁻³)	pH ² (CaCl ₂ H ₂ O)		H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	K ¹	Ca ³	Mg ³	SB	CTC	V	C ⁴	MO
				----- (cmol _c dm ⁻³)-----							(%)		(g dm ⁻³)
0,0 – 0,20	11,2	5,1	6,1	3,68	0,0	0,47	3,91	1,94	6,32	10,0	63,20	15,11	26,04

(¹): Extrator Mehlich 1; (²): CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; (³): KCl 1 mol L⁻¹; (⁴): Método Walkley-Black.

Clima predominante na região é do tipo Cfa, mesotérmico úmido, com chuvas abundantes no verão e inverno seco com verões quentes, segundo classificação de Köppen (IAPAR, 1987). Os dados locais de precipitação pluvial, temperatura máxima e mínima diária, referentes ao período de duração do experimento em campo, estão apresentados na Figura 1. Os dados foram coletados diariamente junto ao Posto Meteorológico da Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM.

Para o ano agrícola 2011/2012, a lâmina bruta de irrigação foi de 14 mm aos 56 e 77 dias após a emergência (Figura 1).

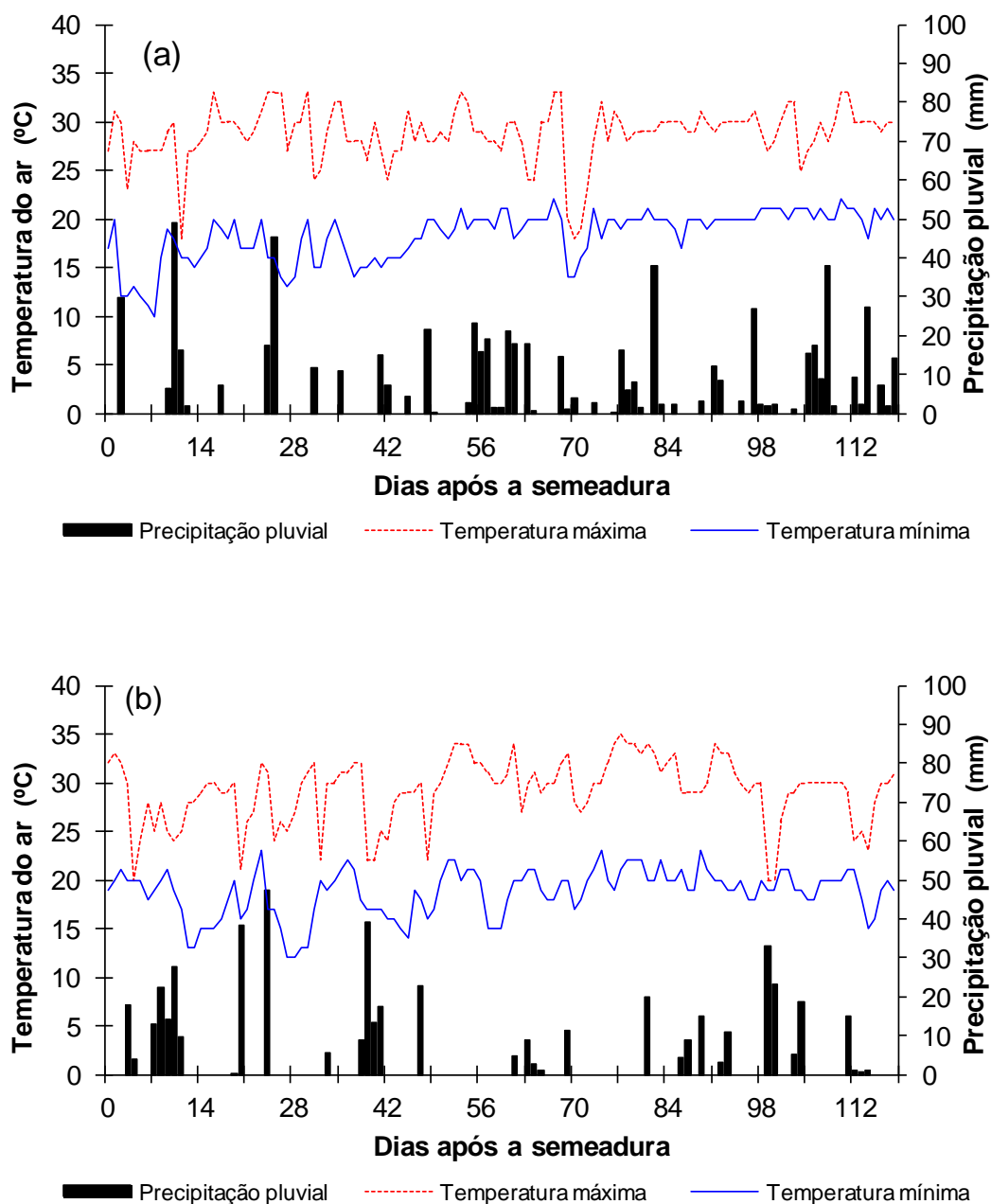


Figura 1. Dados climáticos diários da precipitação pluvial, temperaturas máximas e mínimas ocorridas durante o período experimental para os anos agrícolas 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b).

Com relação ao manejo de pré-semeadura, noventa dias antes da instalação do primeiro experimento realizou-se a calagem do solo, com a aplicação de $1,0 \text{ t ha}^{-1}$ de calcário calcítico (PRNT 85), incorporado ao solo, visando a elevação da saturação por bases acima de 60% (EMBRAPA, 2012).

Na área experimental na safra de inverno era semeado canola e na safra de verão era semeado milho.

A área experimental foi dessecada 10 dias antes com 2,5 L kg⁻¹ do herbicida Glyphosate, associado com 1 L ha⁻¹ de 2,4-D-dimetilamina, mais 0,5 L ha⁻¹ de óleo mineral (EMBRAPA, 2012).

Cada parcela experimental foi constituída por cinco linhas de plantas com 6,0 m de comprimento, espaçadas em 0,9 m. As avaliações foram realizadas nas três linhas centrais, excluindo 0,5 m das extremidades de cada linha, totalizando 13,5 m² de área útil.

Os tratamentos foram constituídos de cinco doses de N (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha⁻¹), na ausência e presença da inoculação das sementes com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, na formulação líquida (Tabela 2), associado à aplicação foliar do biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹), no estágio V₄. O esquema detalhado dos tratamentos encontra-se apresentado na Tabela 3.

O biorregulador líquido é composto por três reguladores vegetais em sua concentração: 90 mg L⁻¹ de cinetina, 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico e 50 mg L⁻¹ de ácido 4-indol-3-ilbutírico e produtos inertes (STOLLER DO BRASIL, 1998).

Tabela 2. Características do inoculante utilizado à base de *Azospirillum brasilense*, produto comercial Marterfix Gramíneas Líquido[®], em dois anos agrícolas

Inoculante	Estirpes	Suporte
<i>Azospirillum brasilense</i> ⁽¹⁾	AbV5 e AbV6	Água

(1): Empresa formuladora: Stoller do Brasil Ltda;
Concentração mínima: 2 x 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹;
Aditivos: poliol, ácido carboxílico, estabilizante/conservante e tensoativo;
Densidade: 1 g mL⁻¹;
Natureza física: líquido (suspensão homogênea);
Dose: 200 mL do produto comercial por hectare, veiculado misturado às sementes.

2.1.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental

Análise do número de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo, foram coletadas amostras de solo ao início de cada experimento, com

trato Uhlund, esterilizado, à superfície e nas profundidades 0,10 a 0,30 m.

As amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados e enviadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

A contagem de microrganismos diazotróficos para determinação da população de bactérias em n° de células por g, foi realizada por meio da estimativa do Número Mais Provável (NMP) usando a tabela de MacCrary em meio semisólido NFB (*Azospirillum* spp.) de acordo com metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995).

Tabela 3. Esquema dos tratamentos de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, doses de N associado a biorregulador, em dois anos agrícolas

Inoculação das sementes ¹	Dose de adubação com N	Aplicação foliar de Biorregulador*
Sem <i>Azospirillum brasilense</i>	0,0 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	45 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	90 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	135 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	180 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
Com <i>Azospirillum brasilense</i>	0,0 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	45 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	90 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	135 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	180 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)

(¹): Inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* (200 mL ha⁻¹).

(*): Aplicação foliar no estágio V₄ com o biorregulador na dose de 250 mL ha⁻¹.

A adubação foi realizada mecanicamente de acordo com a extração média de nutrientes pela cultura do milho, com produtividade esperada de 10.000 kg ha⁻¹, considerando os resultados da análise de solo. A adubação de semeadura para os dois anos agrícolas (2010/2011 e 2011/2012) foi realizada

de acordo como descrito por Fornasieri-Filho (2007). Os adubos utilizados na semeadura foram o Sulfato de Amônio (20% de N), Superfosfato Triplo (41% de P_2O_5) e Cloreto de Potássio (60% de K_2O), mediante aplicação de 20, 40 e 80 $kg\ ha^{-1}$ de N, P_2O_5 e K_2O , respectivamente.

A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada manualmente no estádio V_4 , a lanço, utilizando Sulfato de Amônio $(NH_4)_2SO_4$, até atingir as doses de 0,0, 45, 90, 135 e 180 $kg\ de\ N\ ha^{-1}$. No estádio V_6 , foi aplicado em cobertura 40 $kg\ de\ K_2O\ ha^{-1}$, na forma de Cloreto de Potássio.

A inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* foi realizada após o tratamento das sementes com o fungicida Carbendazim + Tiram na dose de 2,5 $mL\ kg^{-1}$ sementes e com o inseticida Imidacloprido + Beta-Ciflutrina com 300 $mL\ ha^{-1}$ (EMBRAPA, 2012).

A inoculação foi realizada momentos antes da semeadura e acondicionadas à sombra. O inoculante com as estirpes AbV5 e AbV6 foi aplicado nas sementes de milho da seguinte forma: após as sementes serem tratadas com o fungicida e inseticida, o inoculante foi veiculado na dose de 200 $mL\ ha^{-1}$, a fim de proporcionar o total recobrimento e, posteriormente, realizada a semeadura.

A semeadura foi realizada em área de plantio direto sob a palhada de aveia nos dias 05/10/2010 e 06/10/2011, com capacidade de campo presente no solo para germinação, em espaçamento de 0,90 m entre as linhas e população de 55.555 plantas ha^{-1} . Foi utilizado o híbrido simples de milho da Pioneer 30F35 YH, que apresentou elevado potencial produtivo (EMBRAPA, 2012).

A aplicação do biorregulador foi realizada no estádio V_4 , na dose de 250 $mL\ ha^{-1}$. Para a aplicação foliar foi utilizado o pulverizador costal propelido a CO_2 , com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), com vazão de 0,65 $L\ min^{-1}$ equipado com lança contendo 1 bico leque da série Teejet tipo XR 110 02, que, trabalhando a uma altura de 50 cm do alvo e a uma velocidade de 1 $m\ s^{-1}$, atingindo uma faixa aplicada de 50 cm de largura, proporcionou volume de calda de 200 $L\ ha^{-1}$. As condições climáticas foram adequadas no momento da aplicação, tanto para o ano agrícola de 2010 (83% de UR e temperatura de 26°C) como para 2011 (80% de UR e temperatura de 28°C).

Em relação aos tratos culturais e fitossanitários, quando atingido o nível

de dano econômico, foram realizados para o desenvolvimento adequado das plantas do experimento, seguindo as recomendações da Embrapa (2012).

Durante o desenvolvimento da cultura foram realizadas capinas manuais e aplicações do herbicida Atrazina, na dose de 5 L ha⁻¹ e Tembotriona, na dose de 200 mL ha⁻¹.

O controle de pragas e doenças, respeitando o nível de dano econômico, segundo as recomendações da Embrapa (2012), foi realizado como manejo integrado o uso dos seguintes tratamentos: aplicação de Lufenurom a 100 mL ha⁻¹, Triflumuron a 30 mL ha⁻¹ Beta-ciflutrina a 20 mL ha⁻¹, para o controle de vaquinhas; Endossulfan a 1,250 mL ha⁻¹ para o controle de pulgões e percevejos; aplicação de Azoxystrobin + Ciproconazole a 300 mL ha⁻¹, para a prevenção das seguintes doenças: mancha branca, mancha foliar, cercosporiose, ferrugem tropical, podridões do colmo e das raízes, podridões de espiga e grãos ardidos, podridão branca da espiga, podridão de *fusarium*, podridão de *gibberela*, grãos ardidos e doenças sistêmicas como o enfezamento (EMBRAPA, 2012).

2.2 Avaliação do desempenho agrônômico

As avaliações dos componentes de produção e a produtividade foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e no Laboratório de Físico-química de Sementes ambos localizados no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (NUPAGRI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da UEM, situada a uma latitude de 23°06' sul e longitude de 51°43' a oeste de Greenwich, com altitude média de 565 m.

As seguintes características agrônômicas foram avaliadas: altura de plantas, altura de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, massa de mil grãos e produtividade.

A avaliação da altura das plantas foi realizada por meio da mensuração do comprimento do colmo (da superfície do solo até a base da inflorescência masculina), momentos antes da colheita, sendo avaliadas dez plantas escolhidas aleatoriamente por parcela (LANA et al., 2009).

Na colheita, foram eliminadas 2 linhas externas (linhas 1 e 5), sendo considerada a área útil para colheita das unidades experimentais as duas

linhas centrais (linhas 2 e 3) e, quando foram coletadas as espigas para determinar o número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira e a folha índice, utilizou-se a linha 4. Na linha 4, foram coletadas aleatoriamente 10 folhas índices e após a maturidade fisiológica, foram coletadas dez espigas em cada parcela experimental, desconsiderando as plantas que foram coletadas as folhas índices.

O número de fileiras de grãos por espiga foi determinado mediante a contagem simples do número de fileiras presentes em uma espiga, seguindo as prescrições de Vieira et al. (2010).

Em relação ao número de grãos por fileira, a referida variável foi determinada mediante contagem simples do número de grãos por fileira presentes em uma espiga, utilizando-se as mesmas espigas em que foi determinado o número de fileiras de grãos por espiga (VIEIRA et al., 2010).

No estágio R1 (emissão do estilo na espiga), realizou-se a amostragem de folhas segundo recomendações de Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Retirou-se a folha índice, que consiste na primeira folha fisiologicamente madura, oposta e abaixo da espiga para cada planta. Foram coletadas dez folhas índice por unidade experimental, as quais foram lavadas em água destilada, identificadas, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada, onde permaneceram por 72 h em temperatura de 70°C, até atingir massa constante. O teor de N foi determinado pelo método Kjeldahl.

Determinação de nitrogênio: foi realizada utilizando-se o método de Kjeldahl, na quantificação de nitrogênio total, conforme recomendação da Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C., 1990) e Vitti et al. (2001), com modificações. Foram analisadas quatro subamostras de 0,2 g da farinha de milho moída, provenientes de amostras de grãos de cada repetição de campo. O milho moído foi condicionado em tubos de ensaio, junto com 2 g de uma mistura catalítica (sulfato de cobre e selênio em pó) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estes tubos foram, posteriormente, levados para aquecimento em um bloco digestor para a fase de digestão da matéria orgânica. O aquecimento foi gradual e, assim que a temperatura de 350°C foi atingida, o material permaneceu a esta temperatura constante por mais 2,5 h. Após a obtenção do material digerido, iniciou-se a fase de destilação da amônia liberada, após a reação com hidróxido de sódio (50%), sendo recolhida

em solução de ácido bórico a 4%. A titulação foi realizada em solução-padrão de ácido clorídrico a 1 N, em que os indicadores foram o vermelho de metila (0,2%) e o azul de metila (0,2%). Obteve-se para esse procedimento a recuperação de 99,7% do nitrogênio. Para o cálculo da conversão de nitrogênio em proteínas, foi utilizado o fator 6,25 e a porcentagem de proteínas foi obtida com base na massa seca.

A colheita das espigas foi realizada manualmente, após a maturação fisiológica, pela presença da “camada negra” ou “ponto preto” formado no local de inserção da semente com o sabugo (EMBRAPA, 2012). Após a coleta das espigas, as mesmas foram debulhadas em máquina trilhadora estacionária. Posteriormente, os grãos foram limpos com o auxílio de peneiras secas em condições naturais e acondicionados em sacos de papel kraft multifoliado.

As avaliações de produtividade e massa de mil grãos foram realizadas após a colheita. Partindo-se da produtividade grãos nas parcelas, foram calculadas as produtividades (kg ha^{-1}) e as massas de mil grãos. Os resultados foram corrigidos para 13% de umidade. O grau de umidade dos grãos foi avaliado por meio do método de estufa a 105°C por 24 horas (BRASIL, 2009). A massa de mil grãos foi determinada, por meio da pesagem de oito subamostras de 100 grãos, para cada repetição de campo, com auxílio de balança Analítica ($\pm 1 \text{ mg}$) e multiplicados por 10 (BRASIL, 2009).

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com seis repetições de campo. Os tratamentos constituíram-se da ausência e presença da inoculação das sementes com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, cinco doses de nitrogênio (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg ha^{-1}) aplicadas na base e em cobertura, e manejo com a aplicação foliar do biorregulador (0,0 e 250 mL ha^{-1}), no estágio V_4 , arranjos em esquema fatorial ($2 \times 5 \times 2$).

Os dados experimentais, de cada um dos anos agrícolas, foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) ($P > 0,01$) e de Levene (BOX, 1953) ($P > 0,01$), para verificação da normalidade e homocedasticidade residuais, respectivamente, mediante emprego do software estatístico SAS (EVERITT, 2001). Posteriormente, atendidas essas

pressuposições, de modo individual em cada experimento, realizou-se a análise de variância para as médias dos tratamentos ($P < 0,05$) (STEEL; TORRIE, 1960), por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

Para trabalhar com a análise conjunta dos dados para os dois anos agrícolas, procedeu-se à verificação da magnitude dos quadrados médios residuais das análises individuais, conforme Pimentel Gomes (1990). Com isso, avaliaram-se as variâncias residuais e a relação entre os quadrados médios residuais, das análises de variâncias individuais, para uma determinada variável resposta na qual não ultrapassou a relação de 7:1, estabelecida por Banzatto e Kronka (1989).

Após a verificação da homogeneidade das variâncias dos resíduos, na análise conjunta dos experimentos, procederam-se os desdobramentos que se apresentaram significativos. Os efeitos das doses de N aplicadas em cobertura foram estudados mediante análise de regressão polinomial, observando-se os resultados do teste F ($P < 0,05$) da análise de variância ($P < 0,05$) e os coeficientes de determinação (CRUZ; REGAZZI, 2001).

Para os efeitos da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, manejos com biorregulador e dois anos agrícolas, estes foram estudados pelo teste F, pois para dois níveis de fatores, o F é conclusivo (BANZATTO; KRONKA 1989).

Para a análise conjunta, adotou-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = m + E_i + b_j/E_i + A_k + B_l + C_m + EA_{ik} + EB_{il} + EC_{im} + AB_{kl} + AC_{km} + BC_{lm} + EAB_{ikl} + EAC_{ikm} + EBC_{ilm} + ABC_{klm} + EABC_{iklm} + e_{ijklm}$$

Em que:

Y_{ijklm} = valor observado na $ijklm$ -ésima parcela;

m = média geral da análise conjunta, sob restrição matemática;

E_i = efeito associado ao i -ésimo experimento;

b_j/E_i = efeito do j -ésimo bloco dentro do i -ésimo experimento;

A_k = efeito do k -ésimo nível do fator A (doses de N);

B_l = efeito do l -ésimo nível do fator B (Inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*);

C_m = efeito do m-ésimo nível do fator C (manejo com biorregulador);
 EA_{ik} = efeito da interação do i-ésimo experimento e com o k-ésimo nível do fator A;
 EB_{il} = efeito da interação do i-ésimo experimento e com o l-ésimo nível do fator B;
 EC_{im} = efeito da interação do i-ésimo experimento e com o m-ésimo nível do fator C;
 AB_{kl} = efeito da interação do k-ésimo nível do fator A com o l-ésimo nível do fator B;
 AC_{km} = efeito da interação do k-ésimo nível do fator A com o m-ésimo nível do fator C;
 BC_{lm} = efeito da interação do l-ésimo nível do fator B com o m-ésimo nível do fator C;
 EAB_{ikl} = efeito da interação do i-ésimo experimento com o k-ésimo nível do fator A com o l-ésimo nível do fator B;
 EAC_{ikm} = efeito da interação do i-ésimo experimento com o k-ésimo nível do fator A com o m-ésimo nível do fator C;
 EBC_{ilm} = efeito da interação do i-ésimo experimento com o l-ésimo nível do fator B com o m-ésimo nível do fator C;
 ABC_{klm} = efeito da interação do k-ésimo nível do fator A com l-ésimo nível do fator B com o m-ésimo nível do fator C;
 $EABC_{iklm}$ = efeito da interação do i-ésimo experimento com o k-ésimo nível do fator A com l-ésimo nível do fator B com o m-ésimo nível do fator C;
 e_{ijklm} = efeito residual associado ao i-ésimo experimento com o j-ésimo bloco, dentro do i-ésimo experimento, com o k-ésimo nível do fator A com o l-ésimo nível do fator B com o m-ésimo do fator C.

2.4 Análise financeira

A análise financeira, o cálculo dos custos com a inoculação das sementes, aplicação de nitrogênio e biorregulador e demais produtos, foi efetuada levando-se em consideração os valores médios regionais de compra dos produtos e insumos, no mês de outubro do ano de 2010 e 2011. Os custos horários das operações agrícolas utilizadas foram obtidos a partir de levantamento realizado

nos arquivos da Associação Paranaense de Planejamento Agropecuário (APEPA, 2014). Foi inserida no cálculo a estimativa do custo com combustíveis e outras práticas comuns no manejo da cultura do milho.

Para o cálculo do custo de produção, foi utilizada a estrutura do custo total de produção (CTP) fornecido pelo Departamento de Economia Rural (DERAL, 2013), seguindo as recomendações de Santos et al. (2008).

A análise financeira foi realizada utilizando-se a sequência de procedimentos adotada por Martin et al. (1997):

a) A receita bruta (RB) refere-se à multiplicação do preço de venda (P.V) por unidade do produto, no caso sacas de 60 kg de grãos de milho pelo número de unidades vendidas (UV).

$$RB = PV.UV \text{ (R\$ ha}^{-1}\text{)}$$

b) A receita líquida (RL) refere-se à diferença entre a receita bruta (RB) e o custo total (CT).

$$RL = RB - CT \text{ (R\$ ha}^{-1}\text{)}$$

c) O preço de equilíbrio (PE) refere-se ao preço pelo qual cada unidade da produtividade colhida (P), no caso, saca de 60 kg, teria que ser vendida para cobrir o custo total (CT).

$$PE = CT/P \text{ (R\$ ha}^{-1}\text{)}$$

d) O índice de lucratividade (IL) constitui a porcentagem da receita líquida (RL) em relação à receita bruta (RB), ou igual à proporção da receita bruta em relação ao que constitui recursos disponíveis.

$$IL = RL/RB.10^2 \text{ (\%)}$$

A variação na receita obtida, na ausência e presença dos respectivos tratamentos, foi realizada levando-se em conta a simulação do valor de venda do milho produzido nos diferentes tratamentos, no mês de abril de 2011 e 2012, mês no qual, normalmente, o produtor realiza a comercialização da sua produção na região de Maringá. Para o preço do milho, foi considerado o preço médio de venda de 1 saco de 60 kg de milho, valor igual a R\$ 23,50. Os pressupostos tomados se baseiam no trabalho de Silva et al. (2005) e Santos et al. (2008).

A análise financeira foi empregada nos tratamentos que apresentaram resultados com diferenças significativas ($P < 0,05$) na análise estatística empregada, e seus diferentes desdobramentos para a variável produtividade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental, para o primeiro ano agrícola foi $7,4 \times 10^1$ NMP g^{-1} . Já para o segundo ano agrícola foi $7,1 \times 10^1$ NMP g^{-1} . Essas diferenças na sobrevivência das bactérias diazotróficas foram, provavelmente, influenciadas pelas condições ambientais.

O crescimento das plantas de milho é influenciado pelas variações na temperatura, radiação solar e disponibilidade hídrica. O atendimento das exigências climáticas da cultura é indispensável para obtenção de elevadas produtividades, bem como necessário para aperfeiçoar a eficiência das práticas de manejo.

O milho comum apresenta exigência hídrica que varia entre 500 e 800 mm (BERGAMASCHI et al., 2004). Desta forma, por meio dos dados climáticos apresentados na Figura 1, infere-se que as 13 semanas de cultivo apresentaram precipitação pluvial total de 642,4 e 490,0 mm, para os anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, respectivamente. A menor precipitação pluvial ocorreu para o ano agrícola 2011/2012 aos 59 dias após a emergência, quando estava no estágio de pendoamento. Com isso, foi necessário realizar o fornecimento suplementar de água, por meio da irrigação.

Para o ano agrícola 2011/2012, a quantidade aplicada com a lâmina bruta foi de 28 mm. Com isso, foi possível minimizar, ou até mesmo evitar, possíveis efeitos negativos do déficit hídrico nas plantas, sobretudo nos períodos mais críticos da cultura, como florescimento e enchimento de grãos (RITCHIE et al., 1993; RESENDE; OLIVEIRA, 2005; NIELSEN et al., 2010).

Do mesmo modo, a Figura 1 revela que durante a condução do experimento, a temperatura do ar foi adequada (temperaturas máximas de 29,0 e 29,1°C e temperaturas mínimas de 18,2 e 18,7°C, para os anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, respectivamente) para o pleno desenvolvimento da cultura, haja vista que a produção do milho é maior em temperaturas consideradas moderadas, entre 18 e 30°C.

O crescimento e desenvolvimento das plantas de milho é favorecida pela ocorrência de amplitudes térmicas entre 15 e 20°C, que ocorrem entre o dia e a noite. Esta condição resulta em elevadas taxas de produtividade de grãos, com a fase crítica entre os estádios V12 e R3, 12 folhas completamente expandidas e grãos leitosos (SHAW, 1988; RITCHIE et al., 1993). O período entre o florescimento masculino e o florescimento feminino constitui a fase mais sensível da cultura do milho aos extremos de temperatura (RITCHIE et al., 1993). Nesta fase, a ocorrência de temperaturas do ar elevadas (> 32°C) acelera os processos de diferenciação das partes reprodutivas da planta de milho, ocasiona elevadas taxas de inviabilidade de grãos de pólen, e resulta em menores produtividades de grãos, com a redução do número de grãos por espiga (SCHOPER et al., 1987; CANTARERO et al. 1999; EDREIRA e OTEGUI, 2012).

Na Tabela 4 encontram-se apresentados os resultados da análise de variância conjunta para as características agrônômicas e da produtividade. Os fatores independentemente avaliados, ou seja: anos agrícolas, *Azospirillum* e doses de nitrogênio (N), foram significativos para todas as variáveis mencionadas, exceto para o fator isolado *Azospirillum* na avaliação de altura de plantas e número de fileiras de grãos por espiga.

Para a variável resposta altura de plantas (Tabela 4), houve diferença significativa na interação de primeira ordem (S x D). Assim, para o número de grãos por fileira houve interações significativas de primeira ordem (S x D), (S x B) e (A x B), enquanto que para massa de mil grãos não houve diferença para as interações (S x A), (S x D) e (A x B). A variável teor foliar de nitrogênio (T.F.N) foi significativo apenas na interação de primeira ordem entre anos agrícolas e doses. Com relação a variável resposta produtividade, apresentou interações significativas de primeira ordem (S x D), (A x B) e (D x B).

Neste caso, para todas as variáveis respostas, foram revelados efeitos não significativos ($P > 0,05$) nas interações de terceira ordem (S x A x D x B). Entretanto, foi necessário realizar os desdobramentos para assegurar possíveis diferenças significativas.

Ainda na Tabela 4, os coeficientes de variação experimental apresentaram-se inferiores a 15% para todas as variáveis respostas avaliadas,

corroborando com o coeficiente de variação para experimentos de milho descritos por Scapim, Carvalho e Cruz (1995) e Fritsche-Neto et al. (2012).

Tabela 4. Resumo da análise de variância conjunta, referente às variáveis respostas: altura de plantas (A.P), número de fileiras de grãos por espiga (N.F.G.E), número de grãos por fileira (N.G.F), massa de mil grãos (M.M.G), teor foliar de nitrogênio (T.F.N) e produtividade (PROD.) em função da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas

F.V ¹	G.L ²	Quadrados médios					
		A.P	N.F.G.E	N.G.F	M.M.G	T.F.N	PROD.
Anos agrícolas (A.a)	1	2,246*	2,408*	228,930*	76039,460*	35,266*	72578463,597*
Azospirillum spp. (A)	1	0,037 ^{ns}	0,461 ^{ns}	199,108*	3789,765*	50,563*	13547856,980*
Doses de N (A)	4	0,435*	3,409*	375,963*	9308,806*	415,768*	12328551,683*
Biorregulador (B)	1	0,002 ^{ns}	0,730 ^{ns}	22,816 ^{ns}	356,8257 ^{ns}	0,201 ^{ns}	2197700,749 ^{ns}
A.a x A	1	0,006 ^{ns}	0,051 ^{ns}	13,348 ^{ns}	4821,556*	0,965 ^{ns}	365055,600 ^{ns}
A.a x D	4	0,051*	0,023 ^{ns}	51,508*	2320,235*	42,700*	3714441,088*
A.a x B	1	0,002 ^{ns}	0,102 ^{ns}	43,350*	1068,926 ^{ns}	0,462 ^{ns}	907080,839 ^{ns}
A x D	4	0,001 ^{ns}	0,323 ^{ns}	3,454 ^{ns}	79,113 ^{ns}	1,673 ^{ns}	1257745,854 ^{ns}
A x B	1	0,018 ^{ns}	0,316 ^{ns}	202,033*	1784,44*	0,651 ^{ns}	7385469,689*
D x B	4	0,000 ^{ns}	0,123 ^{ns}	5,626 ^{ns}	434,848 ^{ns}	1,093 ^{ns}	2124257,923*
A.a x A x D	4	0,004 ^{ns}	0,410 ^{ns}	5,104 ^{ns}	13,486 ^{ns}	4,790 ^{ns}	471492,383 ^{ns}
A.a x A x B	1	0,000 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,937 ^{ns}	943,749 ^{ns}	0,064 ^{ns}	605812,007 ^{ns}
A.a x D x B	4	0,000 ^{ns}	0,205 ^{ns}	1,603 ^{ns}	83,850 ^{ns}	2,795 ^{ns}	1878116,029 ^{ns}
A x D x B	4	0,001 ^{ns}	0,266 ^{ns}	9,418 ^{ns}	41,984 ^{ns}	0,761 ^{ns}	253277,977 ^{ns}
A.a x A x D x B	4	0,001 ^{ns}	0,610 ^{ns}	4,946 ^{ns}	164,102 ^{ns}	0,172 ^{ns}	829212,237 ^{ns}
Blocos/Anos	10	0,034	8,49	51,121	2474,284	8,592	2202129,35
Resíduo	190	0,012	0,537	11,140	416,724	2,393	800786,158
Total	239						
Média Geral		2,19	16,37	33,21	280,02	7392,04	7392,04
C.V ³ (%)		5,08	4,48	10,05	7,29	12,11	12,11

(¹): Fontes de Variação; G.L: Graus de Liberdade; (*): Significativo pelo teste "F" a 5% de probabilidade; (^{ns}): não-significativo; (³): Coeficiente de variação.

De acordo com os resultados obtidos para altura de plantas (Tabela 5), observa-se que as doses de N aplicadas no ano agrícola 2010/2011 proporcionaram valores significativos superiores, quando comparados com o ano agrícola 2011/2012. Diante destes resultados é provável que a ocorrência da maior precipitação pluvial e o maior fornecimento de luz ocorrido no primeiro ano agrícola (Figura 1) possa ter proporcionado maior fotossíntese líquida,

consequentemente, proporcionou maior altura de plantas. Isto provavelmente ocorreu devido ao fato das temperaturas diurnas estarem em elevação e as temperaturas noturnas ainda eram amenas para o ano agrícola 2010/2011, o que resultou na maior altura de plantas (SHAW, 1988; BIRCH et al., 1998; TOLLENAAR, 1999).

Além disso, a altura de plantas pode estar relacionada com o número potencial de folhas da planta de milho ser influenciado pelo ambiente, pois integra a ação da temperatura sobre a evapotranspiração e a absorção de nutrientes, durante a fase crítica de determinação dos caracteres vegetativos, proporcionando a diferença na altura de plantas de um ano para outro (RITCHIE et al., 1993; TOLLENAAR, 1999).

Tabela 5. Resultados médios da altura de plantas (m), em diferentes doses de N, em dois anos agrícolas

Doses de N (kg ha ⁻¹)	2010/2011	2011/2012
0,0	2,11 A	2,01 B
45	2,12 A	2,05 B
90	2,29 A	2,09 B
135	2,37 A	2,13 B
180	2,43 A	2,17 B
C.V (%)	5,08	

Letras maiúsculas iguais na linha, entre anos agrícolas, não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste F.

A altura de planta apresenta relação com o suprimento de nutrientes minerais na planta, principalmente o N, que exerce papel fundamental na formação dos tecidos vegetais (MARSCHNER, 2011).

Os resultados referentes à regressão polinomial para altura de plantas, com diferentes doses de nitrogênio, em dois anos agrícolas, estão apresentados na Figura 2. Neste caso, é possível afirmar que a cada 1 kg ha⁻¹ de N aplicado, a taxa de crescimento da planta em altura incrementa o dobro de um ano para outro e tanto a inoculação das sementes, quanto a aplicação do biorregulador, não proporcionaram crescimentos significativos na altura das plantas. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Cavallet et al. (2000), no qual a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum* spp.

não influenciou na altura de plantas de milho. Por outro lado, Kappes et al. (2013), ao trabalharem com a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, obtiveram maior inserção de espiga e altura de planta.

Logo, a maior altura de plantas no primeiro ano agrícola, provavelmente ocorreu pela maior disponibilidade hídrica, ou seja, 642,4 mm comparado com 490 mm do segundo ano agrícola (Figura 1).

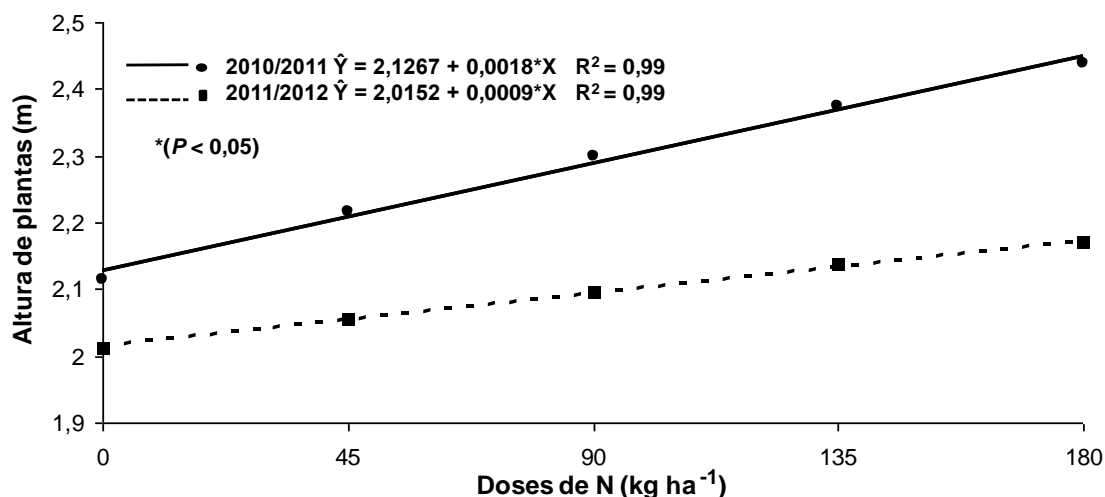


Figura 2. Regressão polinomial da altura de plantas (m) em resposta ao aumento da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Ainda vale destacar, com esta resposta linear, a dose de 180 kg ha⁻¹ N não atingiu o máximo de resposta para esta variável, ou seja, para altura de plantas este híbrido ainda é responsivo ao N com doses maiores que 180 kg ha⁻¹.

De acordo com Soratto et al. (2010), plantas demasiadamente nutridas em nitrogênio possuem maior capacidade de se desenvolverem vegetativamente, pelo fato do nutriente agir diretamente na divisão e na expansão celular, aumentando, conseqüentemente, o número e o comprimento dos internódios, afetando, assim, a altura da planta.

Castro (2008) afirma que a altura da planta é influenciada pela disponibilidade de nitrogênio, uma vez que este nutriente participa diretamente

da divisão e expansão celular e do processo fotossintético. Ainda segundo esse autor, o efeito do aumento da dose de N na altura de plantas de milho é visível somente até determinada fase de crescimento, pois, com o aumento do autossombreamento das plantas, assim como o sombreamento mútuo entre elas, ocorre redução do crescimento, até que a altura máxima seja atingida, quando do florescimento.

Na Tabela 6, estão apresentados os resultados referentes ao número de fileiras de grãos por espiga, em função das diferentes doses de nitrogênio, em dois anos agrícolas. Observa-se que no primeiro ano agrícola foi obtido o maior número de fileira de grãos por espiga. Esses resultados são semelhantes ao de altura de plantas. Por outro lado, a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* e a aplicação do biorregulador não apresentaram efeitos significativos, independentemente dos anos agrícolas avaliados.

Roesch et al. (2006) verificaram que a colonização de plantas de milho por bactérias diazotróficas foi inibida por altas doses de nitrogênio durante os primeiros estádios de crescimento.

Tabela 6. Resultados médios do número de fileiras de grãos por espiga, em função de diferentes doses de N, em dois anos agrícolas

Doses de N (kg ha ⁻¹)	2010/2011	2011/2012
Média	16,46 A	16,26 B
C.V (%)	4,48	

Letras maiúsculas iguais na linha, entre anos agrícolas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na Figura 3 está apresentada a regressão polinomial do número de fileiras de grãos por espiga, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação do biorregulador, em dois anos agrícolas. O melhor ajuste foi obtido para a regressão $\hat{Y} = 16,04 + 0,037X$, com R² de 0,96. Com base no coeficiente angular da equação de regressão (Figura 3), ocorreu aumento no número de fileiras de grãos por espiga de 0,0037 fileiras para cada 1 kg ha⁻¹ de N aplicado. O ajuste linear crescente, em função da adubação nitrogenada correlaciona-se significativamente com a importância do nitrogênio no

desempenho agrônomo das plantas e nos componentes de produção. Esses resultados corroboram com Carmo et al. (2012), que obtiveram aumento linear significativo dessa característica, em resposta ao aumento das doses de N.

Repke et al. (2013), Goes et al. (2012) e Vilela et al. (2012) não obtiveram incrementos no número de fileiras de grãos por espiga com as crescentes doses de nitrogênio na cultura do milho.

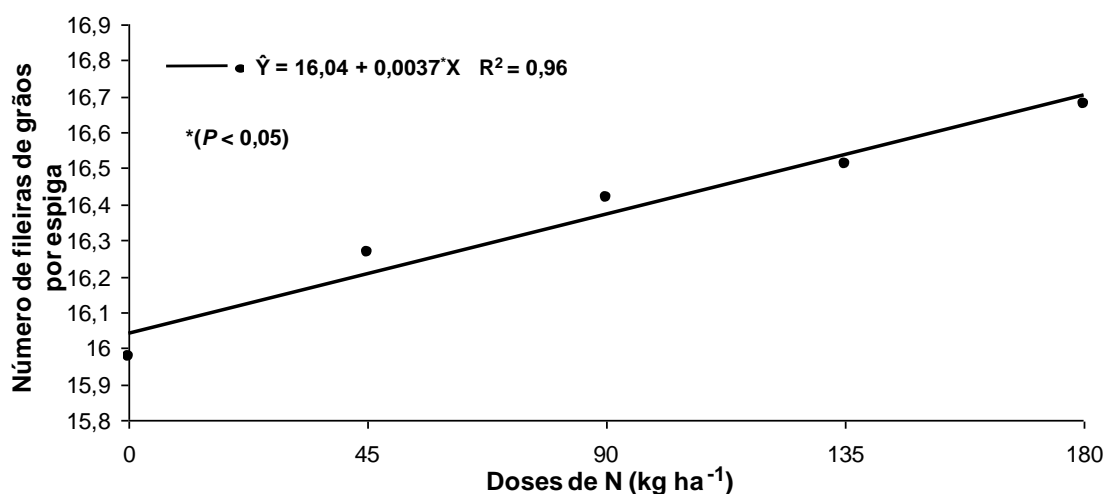


Figura 3. Regressão polinomial do número de fileiras de grãos por espiga, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação com biorregulador, em dois anos agrícolas.

O nitrogênio está presente na constituição das bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), enzimas, fitocromos, coenzimas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), fitohormônios e molécula de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013; BISSANI et al., 2008; ANDRADE et al., 2003). Sua deficiência reduz o crescimento vegetativo e reprodutivo (FERREIRA et al., 2001).

De acordo com os resultados do número de grãos por fileira, apresentado na Tabela 7, é possível observar que houve aumento significativo na ausência da inoculação com *Azospirillum brasilense*, associado ao manejo do biorregulador, com incremento de 3,65 grãos por fileira por espiga. Assim, na ausência da aplicação exógena do biorregulador, a inoculação das sementes proporcionou incrementos significativos de 2,45 grãos por fileira. Neste caso, evidencia-se que quando se utiliza uma das tecnologias não há necessidade de utilizar a outra.

A característica principal do *Azospirillum brasilense* é capacidade de produzir mudanças na arquitetura do sistema radicular da planta, promovendo o desenvolvimento de raízes laterais e adventícias (CREUS et al., 2005; FAVERO et al., 2008). Provavelmente, a inoculação com *Azospirillum brasilense* permite antecipação na formação do sistema radicular e, conseqüentemente, melhor exploração dos recursos disponíveis no solo, tornando as plantas mais eficientes.

Segundo Mehnaz e Lazarovits (2006), o sucesso da interação *Azospirillum* planta está relacionado, na maioria das vezes, a fatores da própria bactéria, tais como a escolha da estirpe, o número ideal de células por sementes e sua viabilidade.

Tabela 7. Resultados médios do número de grãos por fileira, sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, associado à aplicação do biorregulador: ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B), em dois anos agrícolas

Inoculante	Biorregulador	
	A.B	P.B
Não inoculado	31,08 Bb	34,73 Aa
Inoculado	33,53 Aa	33,51 Aa
Anos agrícolas	Biorregulador	
	A.B	P.B
2010/2011	34,31 Aa	34,07 Aa
2011/2012	31,50 Bb	32,97 Aa
C.V (%)	10,05	

Letras minúsculas iguais na coluna na ausência e presença do inoculante nas sementes, dentro de manejo de biorregulador, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F. Letras maiúsculas iguais, na linha, entre aplicação de biorregulador e, dentro da inoculação das sementes, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F.

As BPCP's, como a *Azospirillum brasilense*, além de realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN), tem efeito estimulatório por diversos mecanismos, destacando a produção de hormônios vegetais como auxinas, citocininas, giberelinas e redução do etileno (TIEN et al., 1979; STRZELCZYK et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 2004; BASHAN et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007; EMBRAPA, 2007; MENDONÇA; URQUIAGA; REIS, 2006).

Essa provável síntese de hormônios vegetais proporcionados pela inoculação das sementes de milho, conforme os resultados da Tabela 7 inibiu a eficiência do biorregulador manejado na dose de 250 mL ha⁻¹ no estágio V₄. Por isso, torna-se necessário realizar mais pesquisas com outras doses, aplicadas em outros estádios, para assegurar a eficácia agrônômica do biorregulador utilizado.

No caso do etileno, a *Azospirillum brasilense* estimula a produção da ACC deaminase promovendo desvio de rota para utilizar os produtos para seu suprimento. Isso leva a redução da síntese do etileno nos tecidos vegetais, reduzindo o efeito da senescência. Neste caso, mantendo os tecidos fotossintetizantes ativos por mais tempo. No caso do milho, observou-se que as folhas baixas dos tratamentos inoculados, permaneceram verdes por mais tempo.

No entanto, vários fatores podem influenciar o aumento no número de grãos por fileira. Alguns estudos têm relatado que cepas da *Azospirillum brasilense* podem produzir auxina (TIWARI et al., 2011; DOORNBOS et al., 2012) e que este efeito do fitohormônio promove o crescimento da raiz (SPAEPEN et al., 2008; BASHAN, DE-BASHAN 2010), melhorando o desempenho agrônômico dos tratamentos em que foi realizada a inoculação.

Ainda na Tabela 7, para o primeiro ano agrícola, proporcionou aumento significativo ($P < 0,05$), como mencionado anteriormente, esse resultado também pode estar associado à maior disponibilidade hídrica, como relatado para as características altura de plantas e número de fileiras de sementes por espiga.

A análise de regressão (Figura 4) permitiu realizar o ajuste de equação linear crescente para número de fileiras de sementes por espiga, cujo modelo permite afirmar a ocorrência de acréscimos significativos de 0,052 e 0,025 sementes por fileira por espiga, respectivamente, para cada quilo de N aplicado, isto é, houve aumento no número de sementes por fileira por espiga de 2,34 e 1,12, respectivamente, para cada 45 kg de N adicionado.

Silva et al. (2005), em estudo com o híbrido simples Pioneer 30F80, constataram que o número de grãos por fileira apresentou um comportamento quadrático em função do aumento da dose de N (0,0, 60, 120 e 180 kg ha⁻¹). Por outro lado, Fernandes et al. (2005) e Goes et al. (2012) não obtiveram

efeito significativo das fontes e doses de nitrogênio no número de grãos por fileira.

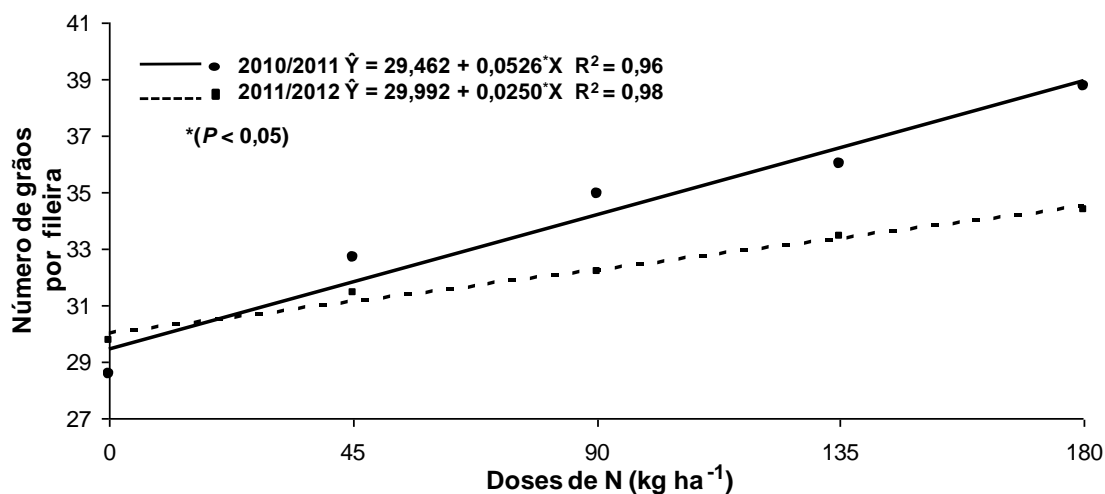


Figura 4. Regressão polinomial do número de grãos por fileira, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da massa de mil grãos, sob efeito da inoculação das sementes, em manejo com biorregulador, em dois anos agrícolas.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que, independentemente das doses de nitrogênio e da aplicação do biorregulador, para o segundo ano agrícola o inoculante exerceu influência significativa sobre a massa de mil grãos. Neste aspecto, justifica-se a prática da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, pois, com aportes adicionais de nitrogênio a massa de grãos de milho é incrementada, melhorando, provavelmente, a formação de espiga e, evidentemente, contribuindo no enchimento de grãos, corroborando com os índices de teor de nitrogênio total nas folhas (Tabela 9).

Desta forma, esses resultados projetam para uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados, podendo minimizar os custos de produção da referida cultura.

Novakowski et al. (2011) obtiveram incrementos significativos na massa de mil grãos de milho, quando realizaram a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, comparado com tratamento controle.

Provavelmente, a inoculação das sementes contribui significativamente para a maior tolerância do milho ao estresse climático, proporcionando ganhos consideráveis na produtividade.

Por outro lado, Kappes et al. (2013) concluíram que a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* e aplicações de nitrogênio em cobertura não influenciaram a massa de mil grãos.

Tabela 8. Resultados médios da massa de mil grãos, sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, em manejo com biorregulador: ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B), em dois anos agrícolas

Anos agrícolas	Inoculante	
	Não inoculado	Inoculado
2010/2011	298,30 Aa	297,30 Aa
2011/2012	253,76 Bb	270,65 Ab
Inoculante	Biorregulador	
	A.B	P.B
Não inoculado	272,05 Bb	280,01 Aa
Inoculado	285,48 Aa	282,46 Aa
C.V (%)	7,29	

Letras minúsculas iguais na coluna, entre anos agrícolas e dentro de inoculante, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F. Letras maiúsculas iguais, na linha, entre ausência e presença do inoculante nas sementes, dentro de anos agrícolas, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Pöttker e Wiethölter (2004) afirmaram que a disponibilidade de N aumenta o potencial da planta em definir maior número e massa de grãos por espiga, aumentando, desse modo, sua massa total.

De acordo com Ulger, Becker e Khant (1995), o referido componente produtivo tem alta dependência da absorção de nitrogênio pelo milho, a qual alcança um pico durante o período compreendido entre o início do florescimento e o início da formação de grãos. A deficiência de nitrogênio, neste período, pode concorrer para a formação de grãos com menor massa específica, devido a não translocação do nutriente em quantidades adequadas para os mesmos.

Novakowiski et al. (2011) relataram que a massa de mil grãos e o número de fileiras por espiga de milho apresentaram resposta quadrática com o aumento da dose de nitrogênio. Zucarelli et al. (2012), trabalhando com milho doce, observaram que as doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura não afetaram a massa de grãos. No entanto, essa premissa não corrobora com os resultados observados por Lana et al. (2009), os quais verificaram aumento na massa de grãos do milho com o incremento de doses de aplicação de nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos para massa de mil grãos (Figura 5) nesse experimento, com incremento linear significativo de 26,19 gramas para 90 kg ha⁻¹ de N aplicado.

Desta forma, os resultados (Figura 5) foram obtidos para o ano agrícola 2010/2011, com as doses crescentes de N. Provavelmente, a disponibilidade de nitrogênio no momento de definição da densidade de grãos, que ocorre no estágio fenológico de grãos leitosos (R3) (SHAW, 1988; RITCHIE et al., 1993; MAGALHÃES et al., 2002), coincidiu com o período de aproximadamente 15 dias de ocorrência de chuvas observado nesse trabalho, uma vez que a eficiência de translocação de fotoassimilados para os órgãos reprodutivos é dependente da disponibilidade de água.

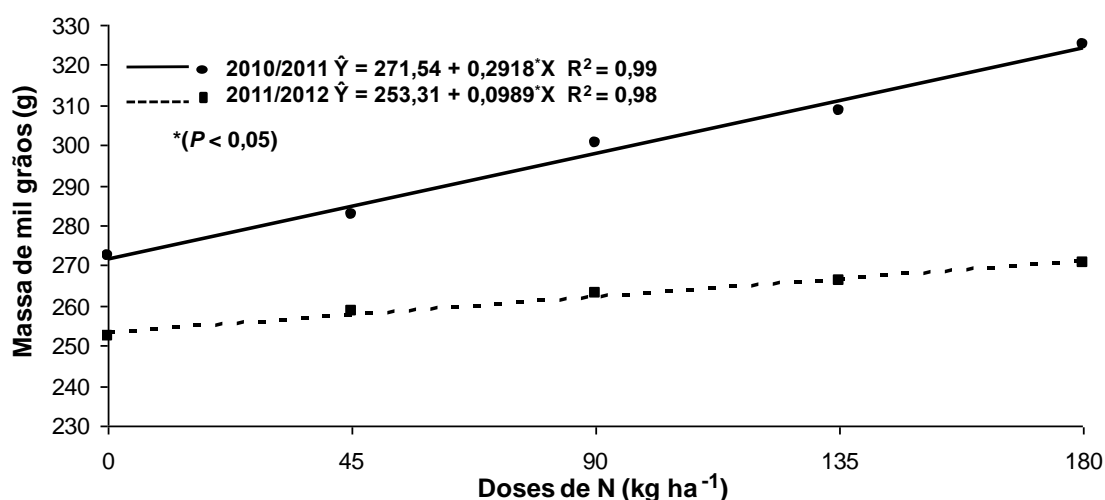


Figura 5. Regressão polinomial da massa de mil grãos, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Oliveira e Caires (2003) verificaram aumento linear na massa de 1.000 grãos, em função do aumento das doses de N, e que tal componente de produção foi decisivo para aumentar a produtividade de grãos. No entanto, Casagrande e Fornasieri Filho (2002) não constataram efeito de doses e de épocas de aplicação de N na massa de 1.000 grãos do milho cultivado em “Safrinha”.

Segundo Ohland et al. (2005), a massa de grãos é uma característica influenciada pelo genótipo, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante os estádios de enchimento dos grãos.

Amaral Filho et al. (2005) verificaram que o aumento nas doses de N de 0 kg ha⁻¹ para 150 kg ha⁻¹ proporcionou maior massa de 1.000 grãos e com efeitos positivos na produtividade de grãos.

Os resultados referentes ao teor de nitrogênio nas folhas estão apresentados na Tabela 9. Em relação ao teor foliar de nitrogênio, nas médias dos anos agrícolas e da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, é possível confirmar que a bactéria promoveu incremento médio significativo de 0,864 g kg⁻¹, ou seja, incremento de 4,4% no teor de nitrogênio, respectivamente. Neste caso, confirma-se que as estirpes AbV5 e Abv6 apresenta a capacidade de fornecer aportes adicionais de nitrogênio para a planta, porém não substitui totalmente a adubação nitrogenada. O maior incremento no teor de N, também pode estar relacionado com o melhor balanço hormonal no qual promove o maior crescimento das plantas.

Tabela 9. Resultados médios do teor de nitrogênio total nas folhas em (g kg⁻¹), sob efeito da inoculação de sementes: não inoculado e inoculado, em dois anos agrícolas

Anos agrícolas	Inoculante	
	Não inoculado	Inoculado
2010/2011 e 2011/2012	19,293 B	20,157 A
C.V (%)	7,85	

Letras maiúsculas iguais, na linha, entre ausência e presença do inoculante nas sementes, dentro de anos agrícolas, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Esta evidência correlaciona-se com os resultados positivos nas variáveis número de grãos por fileira, massa de mil grãos e produtividade proporcionado pelo aumento no teor de nitrogênio.

É provável que o incremento esteja relacionado com a maior disponibilidade de exsudatos radiculares que variam conforme a disponibilidade de nutrientes e o tipo de solo (COMPANT et al., 2010).

Além disso, há relatos que a inoculação com *Azospirillum brasilense* promova benefícios para a planta, por meio do maior acúmulo de P e K (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004). Desse modo, os benefícios da inoculação com *Azospirillum brasilense* vão além da fixação biológica do nitrogênio, razão pela qual as bactérias são classificadas como promotoras do crescimento de plantas (HUNGRIA, 2011).

Quanto ao teor foliar de N (Figura 6), para o qual houve interação significativa entre anos agrícolas e entre doses, no ano agrícola 2010/11 foi observado acréscimo de $9,61 \text{ g kg}^{-1}$ até a dose de 135 kg ha^{-1} de N. Por outro lado, para o ano agrícola 2011/2012 obteve-se incremento inferior, de $6,46 \text{ g kg}^{-1}$ até a dose de 135 kg ha^{-1} de N. A maior disponibilidade de N para o ano agrícola 2010/2011 pode estar relacionada com as condições climáticas mais favoráveis observadas no primeiro ano agrícola. No entanto, os valores médios de N obtidos em função das doses em estudo estão próximos dos valores descritos por Malavolta et al. (1997) como adequados para a cultura do milho ($27,5$ a $32,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ N}$).

O suprimento de N pode afetar o crescimento vegetal e a produtividade de grãos, alterando a área foliar e a capacidade fotossintética, na qual existe forte relação entre concentração de N foliar e taxa fotossintética foliar, em função da composição de enzimas fotossintéticas (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2006). A maior disponibilidade de N, há uma maior capacidade fotossintética, pois a fotossíntese necessita de uma quantidade substancial de pigmentos e proteínas para realizar os processos fotoquímicos e carboxilativos (ANDREEVA et al., 1998).

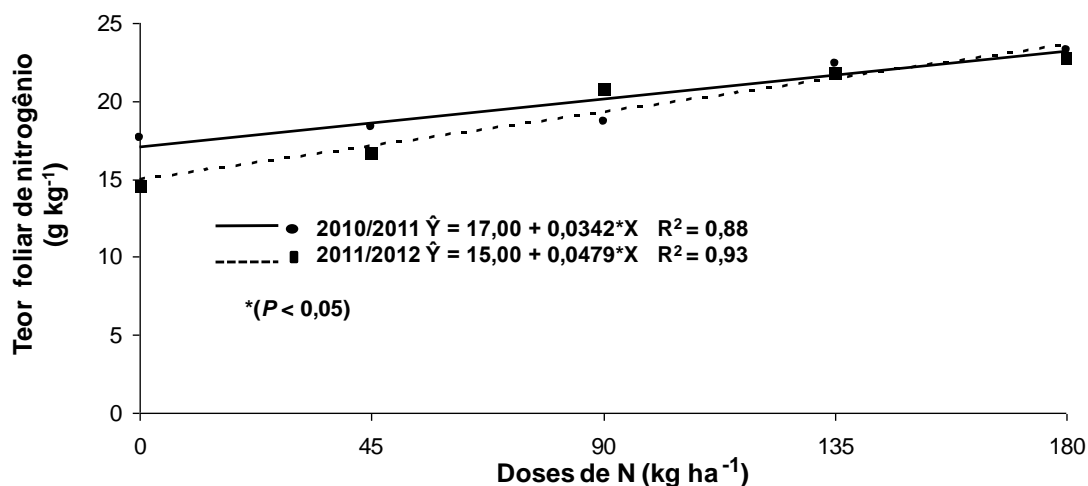


Figura 6. Regressão polinomial do teor de nitrogênio nas folhas, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados médios da produtividade do milho (em kg ha⁻¹), sob efeito da inoculação e do manejo com biorregulador. Os resultados visualizados na Tabela 10 apontam a eficácia agrônômica do uso do biorregulador avaliado, no qual refere-se a condições específicas de uso, na ausência do inoculante.

Na ausência da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* e na presença da aplicação do biorregulador, houve incrementos de 9,02 sacos por hectare. Logo, na ausência do biorregulador e na presença do inoculante, houve incrementos mais elevados, com 13,76 sacos por hectare (Tabela 10).

Contudo, a resposta não significativa da inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense*, associado ao manejo de biorregulador no estágio V₄, sobre a produtividade, pode ser explicada pela evidência da excreção de hormônios vegetais, principalmente o ácido indolacético (AIA), citocinina e giberelina produzidos pelas bactérias diazotróficas (STRZELCZYK et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 2004; BASHAN; DE-BASHAN, 2010), que desempenham papel essencial na promoção do crescimento das plantas, (Tabela 10).

Além disso, o *Azospirillum brasilense* tem capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, em associação com várias espécies não leguminosas,

que por sua vez, promove o crescimento das plantas com incremento na produtividade e com a diminuição da utilização de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2010). Hungria (2011) relata que nos tratamentos que receberam 100% de nitrogênio na forma mineral, o efeito da inoculação com *Azospirillum* foi em geral anulado.

Estudos revelam que a fixação biológica do nitrogênio promovida pelo *Azospirillum brasilense* é mínima, dependente de vários fatores, como tipo de solo, a estirpe bacteriana, planta hospedeira e condições climáticas (BASHAN et al., 2004; BASÃ; BASHAN, 2010; HUNGRIA et al., 2010).

A inoculação com *Azospirillum* spp., na ausência de adubação nitrogenada, proporcionou incrementos na produtividade de 15,4 e 7,4% na cultura do milho (LANA et al., 2012).

Repke et al. (2013) avaliaram a eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho e não obtiveram incrementos satisfatórios. Hungria et al. (2010) também obtiveram incrementos na produtividade de milho e, dependendo da estirpe de *Azospirillum brasilense* avaliada, o aumento na produtividade foi da ordem de 24 a 30%, correspondendo a 662 e 823 kg ha⁻¹.

Novakowiski et al. (2011), estudando a inoculação com *Azospirillum brasilense*, observou que essa prática proporcionou produtividade superior ao controle, mesmo com o aumento da dose de nitrogênio aplicada. Braccini et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes para a cultura do milho, constatando que a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* na fórmula líquida promoveu aumento na produtividade de grãos de milho.

Ferreira et al. (2013), trabalhando com solo de cerrado, obtiveram aumento de 29% na produtividade para o tratamento com *Azospirillum brasilense*, em relação a aplicação isolada de nitrogênio. Dobbelaere, Vanderleyden e Okon (2003) obtiveram respostas positivas na inoculação com *Azospirillum brasilense*, inclusive quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, o que indica que as respostas da planta não ocorrem apenas em razão do N₂ fixado, mas, também por outros processos de promoção de crescimento.

Destaca-se que o fato da *Azospirillum brasilense* promover o crescimento das plantas de várias formas, destacando-se o melhor

aproveitamento dos fatores de produção, inclusive associado a doses de nitrogênio.

Tabela 10. Resultados médios da produtividade em (kg ha^{-1}), sob efeito da inoculação: não inoculado e inoculado, em manejo com biorregulador: ausência do biorregulador (A.B) e presença do biorregulador (P.B)

Inoculante	Biorregulador	
	A.B	P.B
Não inoculado	6.883,34 Bb	7.425,57 Aa
Inoculado	7.709,36 Aa	7.549,90 Aa
C.V (%)	12,11	

Letras minúsculas iguais na coluna na ausência e presença do inoculante nas sementes, dentro de manejo de biorregulador, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F. Letras maiúsculas iguais, na linha, entre aplicação de biorregulador e, dentro da inoculação das sementes, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F.

O efeito do biorregulador com o inoculante sobre as características agrônômicas, tais como número de fileiras por espiga, massa de mil grãos e produtividade, provavelmente ocorreu em função do desbalanço hormonal, o qual provavelmente afetou o número grãos por fileira por espiga. Segundo Vieira e Castro (2001), Leite et al. (2003) e Taiz e Zeiger (2013), os efeitos fisiológicos negativos ao crescimento e desenvolvimento vegetal, podem ocorrer em função do desbalanço hormonal.

Zhang e Schmidt (2000) afirmam que biorreguladores são eficazes quando aplicados em pequenas concentrações, uma vez que favorecem o bom desempenho dos processos vitais das plantas e causam maior produtividade e produtos com melhor qualidade.

Segundo Dantas et al. (2012), a aplicação de reguladores de crescimento durante os estádios iniciais de desenvolvimento da planta promove o crescimento da raiz, permite a rápida recuperação após o estresse hídrico, melhora a absorção de nutrientes e, também, a produtividade.

Considerando que o crescimento e desenvolvimento das plantas de milho são regulados por uma série de hormônios vegetais, cujas biossínteses e degradações se produzem em resposta a uma complexa interação de fatores fisiológicos, metabólicos e ambientais.

Desta forma, as estirpes testadas Ab-V5 e Ab-V6 apresentam vários mecanismos que agem simultaneamente ou em sucessão, promovendo o crescimento da planta e o melhor desempenho agrônômico, conferindo maiores produtividades no milho (Tabela 10).

Em relação às doses de N (Figura 7), observou-se efeito sobre a produtividade para o ano agrícola 2010/2011, na qual o melhor ajuste obtido foi com o modelo linear $\hat{Y} = 5.579,0 + 26,245X$, com R^2 de 0,99. Para o ano agrícola 2011/2012, o melhor ajuste obtido foi com o modelo linear $\hat{Y} = 5166,7 + 18,616X$, com R^2 de 0,99. Os modelos permitiram afirmar a ocorrência de acréscimo de 26,24 e 18,61 kg ha⁻¹ de grãos, respectivamente, para cada quilo de nitrogênio adicionado. Portanto, houve aumento na produtividade de 1.180,8 e 837,5 kg ha⁻¹ de grãos, respectivamente, para cada 45 kg de N adicionado, em dois anos agrícolas.

Amaral Filho et al. (2005), em estudo sobre espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho, verificaram resposta linear na produtividade da cultura, em função do aumento da dose até 150 kg ha⁻¹ de N.

Em relação às doses de nitrogênio, tanto Santos et al. (2013) quanto Fontoura e Bayer (2009), obtiveram incrementos lineares na produtividade para cada kg de nitrogênio aplicado.

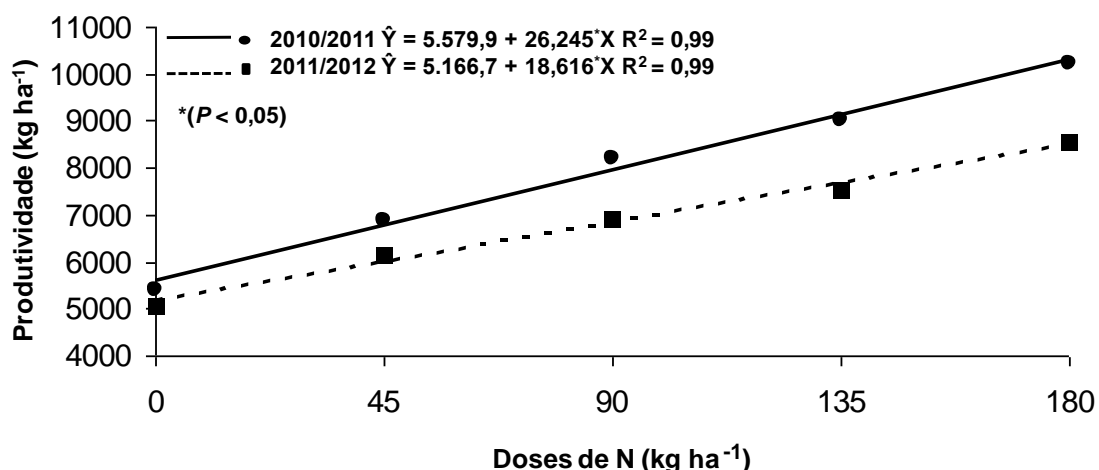


Figura 7. Regressão polinomial da produtividade, em função da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Em contrapartida, Ferreira et al. (2009) observaram decréscimo na produtividade da cultura do milho com doses superiores a 165 kg ha⁻¹ de N. Farinelli e Lemos (2010) obtiveram ajuste quadrático da produtividade, em função do aumento da dose de N em cobertura, alcançando a máxima produtividade em 92 kg ha⁻¹ de N.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 7), a maior disponibilidade de N potencializou os processos de absorção, assimilação e metabolismo do nitrogênio e, possivelmente, contribuíram para o aumento na síntese protéica e nas taxas fotossintéticas, as quais provavelmente acarretaram em acréscimos lineares no carregamento de fotoassimilados para os grãos e, em decorrência, na elevação da produtividade.

Nesse sentido, a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* e aplicação de N pode contribuir para a economia de fertilizantes nitrogenados, assim como melhorar a eficiência de uso dos recursos disponíveis. Por isso, é necessário desenvolver técnicas que possibilitem a redução das perdas de N, aumentando a eficiência de absorção e, conseqüentemente, obtendo maiores produtividades.

Essas produtividades mais elevadas podem ser correspondidas pela adoção de técnicas que proporcionem melhor desempenho das plantas de milho, como a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* ou com a aplicação exógena de biorregulador.

Em relação à análise financeira para ambos os anos agrícolas, foram assumidos para cálculos os valores de produtividade expressos pelas médias do efeito principal inoculação com *Azospirillum brasilense*, aplicação de biorregulador e doses de nitrogênio, significativo a 5% de probabilidade. Os indicadores da análise financeira estão presentes na Tabela 11.

Evidentemente, pode-se afirmar que, independentemente das doses de nitrogênio, a presença do inoculante e a ausência do biorregulador, proporcionaram produtividade média equivalente a 7.709 kg ha⁻¹, enquanto que na ausência do inoculante e biorregulador a produtividade média foi 6.883 kg ha⁻¹, ou seja, em média, houve acréscimo de 826 kg ha⁻¹. Neste sentido, evidencia-se que é viável utilizar o inoculante, pois com custo de R\$ 20,00 ha⁻¹ tem-se lucratividade de R\$ 303,00 ha⁻¹.

É possível demonstrar que o manejo do biorregulador na cultura do milho deve ser criterioso no sentido de almejar maior retorno econômico. Assim, ressalta-se que a metodologia empregada apenas nos tratamentos que apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) para a variável produtividade.

Tabela 11. Resultados da análise de rentabilidade da cultura do milho, em função do desdobramento de *Azospirillum* x Biorregulador. Médias da produtividade das doses de N para os dois anos agrícolas

Tratamentos	P.M ¹ kg ha ⁻¹	C.T ² R\$ ha ⁻¹	R.B ³ R\$ ha ⁻¹	R.L ⁴ R\$ ha ⁻¹	P.E ⁵ R\$	I.L ⁶ (%)
Aus. Ino/Aus. Bio	6.883,34	2.487,8	2.695,51	207,71	21,68	7,70
Aus. Ino/Pre. Bio	7.425,57	2.532,8	2.907,85	375,05	20,46	12,89
Pre. Ino/Aus. Bio	7.709,36	2.507,8	3.018,98	511,18	19,51	16,93
Pre. Ino/Pre. Bio	7.549,91	2.552,8	2.956,54	403,74	20,28	13,65
0,0 kg ha ⁻¹ N	5.204,31	2.067,8	2.038,00	-29,79	23,83	-1,46
45 kg ha ⁻¹ N	6.515,42	2.277,8	2.551,43	273,63	20,97	10,72
90 kg ha ⁻¹ N	7.560,11	2.487,8	2.960,53	472,73	19,74	15,96
135 kg ha ⁻¹ N	8.279,88	2.697,8	3.242,40	544,60	19,54	16,79
180 kg ha ⁻¹ N	9.339,48	2.907,8	3.657,34	749,54	18,68	20,49

(¹) P.M: Produtividade média; (²) C.T: Custo total; (³) R.B: Receita bruta; (⁴) R.L: Receita líquida; (⁵) P.E: Preço de equilíbrio; (⁶) I.L: Índice de lucratividade; Aus. Ino/Aus. Bio: ausência do inoculante e biorregulador; Aus. Ino/Pre. Bio: ausência do inoculante e presença do biorregulador; Pre. Ino/Aus. Bio: Presença do inoculante e ausência do biorregulador; Pre. Ino/Pre. Bio: Presença do inoculante e biorregulador.

Em relação às doses de nitrogênio, por se tratar de híbrido simples com alto potencial produtivo, em termos econômicos, os maiores valores de receita líquida (R.L) e índice de lucratividade (I.L) foram verificados quando se aplicou 180 kg ha⁻¹ N (R.L R\$ 749,54 e I.L 20,49%). Isto é, mesmo com o custo oneroso do nitrogênio é viável a aplicação, pois supera os custos e proporciona retorno econômico ao produtor.

Segundo Freire et al. (2010), para a recomendação de adubação nitrogenada na cultura do milho, é fundamental considerar o retorno econômico, considerando o custo do nitrogênio.

Dessa forma, é de suma importância determinar a fonte e a quantidade de aplicação de N, buscando sempre alcançar a máxima eficiência econômica, em função da alta competitividade do mundo globalizado, principalmente no Brasil.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse experimento permitiram concluir que:

O tratamento de sementes com inoculante não influenciou na altura de plantas e no número de fileiras de grãos.

O uso do inoculante não substituiu totalmente as adubações nitrogenadas no milho.

A interação entre a aplicação de 250 mL ha⁻¹ de biorregulador em V₄ e a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, não proporcionou incrementos significativos na produtividade.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* via sementes proporcionou incrementos de 11% na produtividade, seguido do incremento do número grãos por fileira e no teor foliar de nitrogênio.

As doses crescentes de nitrogênio proporcionaram incrementos nas seguintes características agronômicas: altura de plantas, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, massa de mil grãos, teor foliar de nitrogênio seguido pelo incremento na produtividade.

A inoculação das sementes de milho proporcionou retorno na ordem de R\$ 303,00 ha⁻¹.

5. REFERÊNCIAS

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by Rhizobium species. **Annals Microbiology**, v. 60, p. 735-745, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting Rhizobium isolate MRP1 on pea-Rhizobium symbiosis. **Science Horticulturae**, v. 129, n. 2, p. 266-272, 2011a.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Pseudomonas aeruginosa strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. **Journal Pest Science**, v. 84, n. 1, p. 123-131, 2011b.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Plant growth promoting fungicide tolerant Rhizobium improves growth and symbiotic characteristics of lentil (*Lens esculentus*) in fungicide-applied soil. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 3, p. 334-342, 2011c.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 245-254, 2012.

ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; ÁVILA, M. R.; BARBOSA, M. C.; RICCI, T. T.; ALBRECHT, A. J. P. Aplicação de biorregulador na produtividade do algodoeiro e qualidade de fibra. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 191-198, 2009.

ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. Biorregulador na composição química e na produtividade de grãos de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 774-782, 2012.

AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 467-473, 2005.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, ed. Especial, p. 1643-1651, 2003.

ANDREEVA, T. T.; MAEVSKAYA, S. N.; VOEVUDSKAYA, S. Y. U. The relationship between photosynthesis and nitrogen assimilation in mustard plants exposed to elevated nitrate rates in nutrient solutions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, n. 6, p. 702-705, 1998.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. **Washington, Association of Official Analytical Chemists**, 15th ed., p.369-406.

APEPA. Associação Paranaense de Planejamento Agropecuário, julho 2014. Disponível em:< http://creditorural.apepa.com.br/registro_ip.htm>. Acesso em: 19 jul. 2014.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, (Issue null) p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; de-BASHAN, L. E. *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247 p.

BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 69-75, 1993.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 831-839, 2004.

BIRCH, C. J.; RICKERTA, K. G.; HAMMER G. L. Modelling leaf production and crop development in maize (*Zea mays* L.) after tassel initiation under diverse conditions of temperature and photoperiod. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 81-95, 1998.

BISSANI, C. A.; GIANELO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. Nitrogênio e Adubos nitrogenados. In: BISSANI, C. A.; GIANELO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. (Ed.) **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.145-168.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crops Research**, v. 11, p. 131-139, 1985.

BOX, G. E. P. Non-normality and tests on variances. **Biometrika**, v. 40, n. 3-4, p. 318-335, 1953.

BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 74-79, 2009.

CANTARERO, M. G.; CIRILO, A. G.; ANDRADE, F. H. Night temperature at silking affects set in maize. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 3, p.703-710, 1999.

CARDOSO, S. M.; SORATTO, R. P.; SILVA, A. H.; MENDONÇA, C. G. Fontes e parcelamento do nitrogênio em cobertura, na cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 1, p.23-28, 2011.

CARMO, M. S.; CRUZ, S. C. S.; SOUZA, E. J.; CAMPOS, L. F. C.; MACHADO, C. G. Doses e fontes de nitrogênio no desenvolvimento e produtividade da cultura de milho doce (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 223-231, 2012.

CASAGRANDE, J. R. R.; FORNASIERI FILHO, D. Adubação nitrogenada na cultura do milho safrinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 33-40, 2002.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2008. 864 p.

CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

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

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Sétimo Levantamento**, abril 2015. Brasília, 2015. 100 p. Disponível em:<

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_10_09_22_05_bol_etim_graos_abril_2015.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2015.

CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, n. 2, p. 297-303, 2005.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

DANTAS, A. C. V. L.; QUEIROZ, J. M. O.; VIEIRA, E. L.; ALMEIDA, V. O. Effect of gibberellic acid and the bioestimulant Stimulate[®] on the initial growth of thamarind. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 008-014, 2012.

DA ROS, C. O.; SALET, L. S.; PORN, R. L.; MACHADO, J. N. C. Disponibilidade de nitrogênio e produtividade de milho e trigo com diferentes métodos de adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 799-804, 2003.

DERAL. Departamento Economia Rural. **SEAB: Secretaria da Agricultura e do abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=75>. Acesso em: 5 Fev. 2013.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995.

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

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 227-243, 2012.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JR., P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; GARCIA, R. A. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação dos solos**. Brasília: Embrapa CNPS, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Avaliação de linhagens de arroz de Terras Altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum***

Sp59b e A. brasilense Sp245. Santo Antônio de Goiás, 2003, 4 p. (Comunicado Técnico, 69).

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, **Sistema de produção de milho**, 8ª. Ed., Versão eletrônica, EMBRAPA- CNPMS: Sete Lagoas, Out/2012, Acesso em 05/ago/2010 Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/index.htm.

EDREIRA, J. I. R.; OTEGUI, M. E. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 87–98, 2012.

EVERETTI, B. **A handbook of statistical analyses using SAS.** 2 ed. Boca Raton, FL: Chapman e Hall/CRC, 2001. 351 p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 97-185, 2005.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; CLARK, R. B. Physiology of crop production. **Food Products Press.** 2006. 345 p.

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B. Produtividade e eficiência agrônômica do milho em função da adubação nitrogenada e manejos de solo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 32, p. 135-146, 2010.

FAVERO, C. M.; CREUS, C. M.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 7, p.1001-1009, 2008.

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

FERREIRA, A. O.; SÁ, J. C. M.; BRIEDIS, C.; FIGUEIREDO, A. G. desempenho de genótipos de milho cultivados com diferentes quantidades de palha de aveia-preta e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 173-179, 2009.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agrônômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p.131-138, 2001.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient

addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108, 2013.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 63 p.

FERREIRA, L. A.; OLIVEIRA, J. A.; VON PINHO, É. V. R.; QUEIROZ, D. L. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 80-89, 2007.

FONTOURA, S. M. V.; BAYER, C. Adubação Nitrogenada para Alto Rendimento de Milho em Plantio Direto na Região Centro-Sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1721-1732, 2009.

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

FREIRE, F. M.; VIANA, M. C. M.; MASCARENHAS, M. H. T.; PEDROSA, M. W.; COELHO, A. M.; ANDRADE, C. L. T. Produtividade econômica e componentes da produção de espigas verdes de milho em função da adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 3, p. 213-222, 2010.

FRITSCHÉ-NETO, R. SCAPIM, C. A.; MIRANDA, G. V.; REZENDE, L. M.; VIEIRA, R. A. Updating the ranking of the coefficients of variation from maize experiments. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 99-101, 2012.

GOES, R. J.; RODRIGUES, R. A. F.; ARF, O.; VILELA, R. G. Nitrogênio em cobertura para o milho (*Zea mays* L.) em sistema plantio direto na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2012.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. (Embrapa Soja. Documentos, 325). 38 p.

IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná. **Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1987. 35 p.

KAPPES, C.; ARF, O.; MARCELO VALENTINI ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

LANA, M. C. WOYTICHOSKI, P. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; AVILA, M. R.; ALBRECHT, L. P. Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.

LEITE, V. M.; ROSOLEM, C. A.; RODRIGUES, J. D. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. **Scientia Agricola**, v. 60, p.537-541, 2003.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Isolation and characterization of N mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. **Chemosphere**, v. 75, n. 6, p. 719-725, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. (Embrapa - CNPMS. Circular Técnica 22). 23 p.

MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. **Piracicaba: POTAFOS**, 1997. 319p.

MAR, G. D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; NOVELINO, J. O. Produção de milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 267-274, 2003.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London: Academic Press, 2011. 672 p.

MARTIN, N. B.; SERRA, R.; OLIVEIRA, M. D. M.; ANGELO, J. A.; OKAWA, H. **Sistema "CUSTAGRI"**: sistema integrado de custos agropecuários. São Paulo: IEA: SAA, 1997. 75 p.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565-572, 2004.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Ghiconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corm plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MEHNAZ, S.; KOWALIK, T.; REYNOLDS, B.; LAZAROVITZ, G. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, 2010.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MILLÉO, M. V. R.; VENÂNCIO, W. S.; MONFERDINI, N. A. Avaliação da eficiência agrônômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 67, (supl.), p. 1-145, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras:Universidade Federal de Lavras, 2002. 625 p.

MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; BARBOSA, M. C. Efeito da aplicação de biorregulador no desempenho agrônômico e produtividade da soja. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, supl. esp., p. 701-709, 2008.

NIELSEN, D. C.; HALVORSON, A. D.; VIGIL, M. F. Critical precipitation period for dryland maize production. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 118, n. 3, p. 259–263, 2010.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, H. J.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1687-1698, 2011.

OHLAND, R. A. A.; SOUZA, L. C. F.; HERNANI, L. C.; MARCHETTI, M. E.; GONÇALVES, M. C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

OLIVEIRA, J. M. S.; CAIRES, E. F. Adubação nitrogenada em cobertura para o milho cultivado após aveia preta no sistema plantio direto. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 351-357, 2003.

PICCININ, G. G.; DAN, L. G. M.; BRACCINI, A. L.; MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S.; BAZO, G.; RICCI, T. T. Agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* in physiological parameters and yield components in wheat crop. **Journal of Agronomy**, v. 10, n. 4, p.132-135, 2011.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; SCAPIM, C. A.; RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 401 p.

PÖTTKER, D.; WIETHÖLTER, S. Épocas e métodos de aplicação de nitrogênio em milho cultivado no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1015-1020, 2004.

PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. 2 ed. New York, Ed. Taylor & Francis Group, 2007. 744 p.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência de *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013.

RESENDE, M.; OLIVEIRA, A. C. Comparação de diferentes estratégias de programação de irrigação suplementar em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 2, p. 205-214, 2005.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. How a corn plant develops. Special Report N^o. 48. Ames: **Iowa State University of Science and Technology**. Cooperative Extension Service, 1993.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SA, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1201-1204, 2005.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V.; SANGEETA, K.; SAMITHA, A. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). **Current Science**, v. 93, n. 9, p. 1296-1300, 2007.

SANTOS, C. M. G.; VIEIRA, E. L. Efeito de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento inicial do algodoeiro. **Magistra**, v. 17, n. 3, p. 124-130, 2005.

SANTOS, G. J.; MARION, J. C.; SEGATTI, S. **Administração de custos na agropecuária**. São Paulo: Atlas, 2008.

SANTOS, C. A. C.; PEIXOTO, C. P.; VIEIRA, E. L.; CARVALHO, E. V.; PEIXOTO, V. A. B. Stimulate[®] na germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de girassol. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 605-616, 2013.

SCHOPER, J. B.; LAMBERT, R. J.; VASILAS, B. L.; WESTGATE, M. E. Plant factors controlling seed set in maize: the influence of silk, pollen, and ear-leaf water status and tassel heat treatment at pollination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 83, n. 2, p. 121-125, 1987.

SHAW, R. H. Climate requirement. In: Sprague, G. F.; Dudley, J. W. (Eds.), **Corn and corn improvement**, 3rd edition. ASA Agronomy Monograph Serial n. 18, ASA, CSSA, SSSA, Madison, p. 609-638, 1988.

SILVA, E. C.; BUZETTI, S.; EDSON LAZARINI, E. Aspectos econômicos da adubação nitrogenada na cultura do milho em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 3, p. 286-297, 2005.

SILVA, E. C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; TRIVELIN, P. C. O. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 477-486, 2006.

SORATTO, R. P.; PEREIRA, M.; COSTA, T. A. M.; LAMPERT, V. N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 511-518, 2010.

SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G. P.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 683-686, 1995.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant & Soil**, v. 312, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York : McGraw-Hill, 1960. 481 p.

STOLLER DO BRASIL. **Stimulate Mo em hortaliças**. Cosmópolis, 1998. v. 1. Informativo Técnico.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, n. 1, p. 55-60, 1994.

SWEDRZYNSKA, D. Effect of Inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 9, n. 5, p. 423-428, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954 p.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

TIWARI, S.; SINGH, P.; TIWARI, R.; MEENA, K.; YANDIGERI, M.; SINGH, D.; ARORA, D. Salt tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. **Biology Fertility of Soils**, v. 47, n. 8, p. 907-916, 2011.

TOLLENAAR, M.; BRUULSEMA, T. W. Efficiency of maize dry matter production during periods of complete leaf area expansion. **Agronomy Journal**, Madison, v. 80, n. 4, p. 580-585, 1988.

ULGER, A. C.; BECKER, A. C.; KHANT, G. Response of maize inbred lines and hybrids to increasing rates of nitrogen fertilizer. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 159, n. 3, p. 157-163, 1995.

VIEIRA, E. L.; SANTOS, C. M. G. Efeito de bioestimulante no crescimento e desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro. **Magistra**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2005.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. **Ação de estimulante no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Piracicaba: USP/Depto. Ciências Biológicas, 2002. 3 p.

VIEIRA, M. A. et al. Cultivares de milho e população de plantas que afetam a produtividade de espigas verdes. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 81-86, 2010.

VILELA, R. G.; ARF, O.; GITTI, D. C.; KAPPES, C.; GOES, R. J.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R. Manejos do milho e doses de nitrogênio na cultura do milho em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 3, p. 234-242, 2012.

VITTI, G. C.; CAMARGO, M. A. F.; LARA, C. **Síntese de análise químicas em tecido vegetal**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.

WANI, P. A., KHAN, M. S. Bacillus species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3262-3267, 2010.

ZHANG, X.; SCHMIDT, R. E. Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. **Crop Science**, v. 40, n. 5, p. 1344-1349, 2000.

ZUCARELI, C.; PANOFF, B.; PORTUGAL, G.; FONSECA, I. C. B. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 480-487, 2012.

CAPÍTULO II

Inoculação com *Azospirillum brasilense*, doses de nitrogênio e biorregulador na qualidade fisiológica e composição de sementes de milho

A pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias apresentam soluções inovadoras que contribuem com a produção e melhor qualidade de sementes. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de doses de N, inoculação e biorregulador na qualidade fisiológica e a composição química das sementes de milho. Para tanto, foram conduzidos experimentos com o híbrido simples de milho 30F35 YH foi semeado nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012. Os tratamentos foram constituídos do híbrido 30F35YH na ausência e presença da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* (0,0 e 200 mL ha⁻¹), cinco doses de N (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha⁻¹) e duas doses de biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos casualizados em esquema fatorial (2 x 5 x 2), com seis repetições. A qualidade fisiológica foi avaliada pelo teste de germinação, teste de frio modificado e de condutividade elétrica. A composição química das sementes foi determinada pela extração de óleo e determinação de proteínas e nitrogênio. Os dados foram submetidos à análise de variância conjunta. Os resultados evidenciaram que o aumento da dose de N pode contribuir para a melhoria da qualidade fisiológica da semente de milho. A aplicação de 113 kg ha⁻¹ de N afeta positivamente o vigor das sementes, expresso pela primeira contagem da germinação e pelo teste de frio modificado. Os conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio nas sementes foram alterados positivamente, em função das doses de nitrogênio. A aplicação de 250 mL ha⁻¹ do biorregulador não influenciou na germinação, bem como nos conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio das sementes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, germinação, regulador vegetal.

Chapter II

Inoculation with *Azospirillum brasilense*, nitrogen doses and regulator on the physiological quality and composition of corn seeds

The research and development of new technologies present innovative solutions that contribute to the production and better quality of seeds. In this sense, the objective of this study was to evaluate the effect of N rates, inoculation and bioregulator on the physiological quality and chemical composition of corn seeds. In order to do so, experiments were conducted with the simple hybrid of corn Pioneer 30F35 YH sown in the agricultural years 2010/2011 and 2011/2012. Treatments were constituted of hybrid 30F35YH in the absence and presence of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* (0.0 and 200 mL ha⁻¹), five N doses (0.0, 45, 90, 135 and 180 kg of N ha⁻¹) and two doses of bioregulator (0.0 and 250 mL ha⁻¹). The experimental design used was in randomized complete blocks, in factorial scheme (2 x 5 x 2) with six replications. Physiological quality was evaluated by germination, modified cold and electrical conductivity tests. Chemical composition of the seeds was determined by oil extraction and determination of proteins and nitrogen. Data were subjected to joint analysis of variance. The results showed that increasing N rate can contribute to the improvement of the physiological quality of maize seed. The application of 113 kg ha⁻¹ of N positively affects seed germination, expressed by the first count of germination and by the modified cold test. Oil, protein, and nitrogen contents in the seeds have changed positively, depending on nitrogen rates. The application of 250 mL ha⁻¹ of bioregulator did not affect germination as well as the oil, protein and nitrogen contents of corn seeds.

Keywords: *Zea mays* L., diazotrophic bacteria, germination, vegetal regulator.

1. INTRODUÇÃO

Sementes de qualidade são à base do agronegócio competitivo e da agricultura de sucesso. A utilização de sementes de alta qualidade é imprescindível para o estabelecimento adequado da cultura do milho no campo, bem como para obter elevada produtividade, quando expostas a diferentes condições ambientais.

Em geral, durante a produção das sementes, várias estratégias são adotadas para garantir a melhor qualidade. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de sementes de elevada qualidade fisiológica e bioquímica tem sido prioridade de muitas pesquisas.

A qualidade das sementes é o somatório de diversos atributos que contribuem para obtenção de plântulas mais vigorosas, que apresentam rápida emergência no campo, além de proporcionar crescimento das plantas e florescimento mais uniforme, possibilitando, assim, produção em termos quantitativos e qualitativos. Entre esses atributos, encontram-se aqueles de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (POPINIGIS, 1985).

Adubação mineral em especial com N, pode influenciar a qualidade das sementes de diversas culturas e os seus efeitos variam conforme as condições ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta em que a aplicação é realizada, refletindo principalmente no tamanho e na massa das sementes, na formação do embrião, com resultados eficazes sobre a viabilidade e no vigor das sementes (MEIRELES et al., 2009; TOLEDO et al., 2009; ABRANTES et al., 2010). O efeito de diferentes doses de N no cultivo de milho sobre a qualidade fisiológica das sementes, todos os híbridos apresentaram elevada qualidade fisiológica, quando cultivados em altos níveis de nitrogênio (GONDIM et al., 2006).

Por outro lado, ao analisar doses e épocas de aplicação de N em cobertura de milho doce, a massa e a germinação das sementes de milho doce não foram influenciadas por doses e épocas de aplicação de N (ZUCARELLI et al., 2012).

A disponibilidade de N é considerada relevante, pois esse elemento é constituinte de enzimas, vitaminas, aminoácidos e proteínas presentes na semente (LEA; AZEVEDO, 2006). No entanto, a adubação nitrogenada influencia não só a produtividade de sementes, mas também a sua qualidade, como consequência do incremento no conteúdo de proteínas nas sementes, que são constituintes importantes no desenvolvimento do embrião (LANDRY; DELYE, 1993; FERREIRA et al., 2001). Por isso, torna-se necessária a adoção de práticas alternativas que visem à redução na aplicação e aumento de eficiência na utilização de insumos nas áreas de produção agrícola. Dentre os processos biológicos que ocorrem na natureza, a fixação biológica do nitrogênio atmosférico é realizada por um grupo restrito de bactérias, denominadas diazotróficas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON; 2003; KAPPES et al., 2013).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) promovem o crescimento de plantas pela produção de exsudatos radiculares (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON; 2003). Além disso, elas são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas e contribuem para aumentar o crescimento da planta, por meio de diversos mecanismos, incluindo efeitos diretos na absorção de nutrientes, tais como, fixação do nitrogênio, mobilização do fósforo, quelante de ferro, bem como no crescimento radicular, por meio da produção de fitormônios (RICHARDSON et al., 2009; SHAHAROONA et al., 2007; YANG et al., 2009).

Com relação aos biorreguladores, eles possuem ampla aplicabilidade fitotécnica em inúmeras culturas e podem ser denominadas substâncias ou associações, com a presença de análogos químicos de hormônios vegetais (ALBRECHT et al., 2011).

Os biorreguladores estão sendo utilizados em diversas culturas tais como o milho (MILLÉO et al., 2000; DOURADO NETO et al., 2004), feijão caupi (OLIVEIRA et al., 2013), girassol (SANTOS et al., 2013), soja (KLAHOLD et al., 2006; ALBRECHT et al., 2011) e algodão (ALBRECHT et al., 2009). Entretanto, o trabalho de Ávila et al. (2008) apresenta resultados científicos que denotam aspectos sobre a qualidade das sementes produzidas sob manejo com biorregulador.

Silva et al. (2008), tratando sementes de milho com Stimulate[®], verificaram uma redução de 38% na germinação. Ferreira et al. (2007) não observaram diferença na germinação das sementes do híbrido simples de milho, quando as sementes foram tratadas com Stimulate[®].

Outros autores trabalhando com o mesmo produto, ou com outros reguladores aplicados exogenamente, verificaram que além de alterar o desempenho agrônômico da soja, o biorregulador proporcionou produção de sementes com potencial fisiológico diferenciado (CAMPOS et al., 2008; 2009).

Além do potencial fisiológico das sementes, deve-se destacar a importância da composição química da semente de milho. A qualidade química está relacionada principalmente com o conteúdo de proteína e a concentração de óleo na semente de milho (EGESEL; KAHRIMAN; GUL, 2011).

De acordo com Reynolds et al. (2005) e Lambert (2001), o milho contém 8,0 a 15% de proteína e a concentração de óleo no milho híbrido varia entre 3,5 a 5,0%, a qual está diretamente relacionada com o tamanho da semente, maturidade fisiológica e a posição da semente na espiga.

Diante do exposto, considerando a importância econômica da cultura do milho e a escassez de informações na literatura, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de doses de N, inoculação e biorregulador na qualidade fisiológica e a composição química das sementes de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução dos experimentos

Os experimentos de campo foram instalados nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, região Noroeste do Estado do Paraná. A FEI encontra-se situada a uma latitude de 23°25' sul e longitude de 51°57' a oeste de Greenwich, com altitude média de 540 m.

O solo da área experimental é classificado como Argissolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999) textura argilosa, (argila: 520 g kg⁻¹; silte: 140 g kg⁻¹ e areia: 340 g kg⁻¹). Os resultados da análise química de material de solo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo na camada de 0 - 20 cm para o solo Argissolo Vermelho distroférico, antes da implantação da cultura

Profundidade (m)	P ¹ (mg dm ⁻³)	pH ² (CaCl ₂ H ₂ O)		H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	K ¹	Ca ³	Mg ³	SB	CTC	V (%)	C ⁴ (g dm ⁻³)	MO
				----- (cmol _c dm ⁻³)-----									
0,0 – 0,20	11,2	5,1	6,1	3,68	0,0	0,47	3,91	1,94	6,32	10,0	63,20	15,11	26,04

(¹): Extrator Mehlich 1; (²): CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; (³): KCl 1 mol L⁻¹; (⁴): Método Walkley-Black.

O clima predominante na região é do tipo Cfa, mesotérmico úmido, com chuvas abundantes no verão e inverno seco com verões quentes, segundo classificação de Köppen (IAPAR, 1987). Os dados locais de precipitação pluvial, temperatura máxima e mínima diária, referentes ao período de duração do experimento em campo, estão apresentados na Figura 1. Os dados foram coletados diariamente junto ao Posto Meteorológico da Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM. Para o ano agrícola 2011/2012, a lâmina bruta de irrigação foi de 14 mm aos 56 e 77 dias após a emergência (Figura 1).

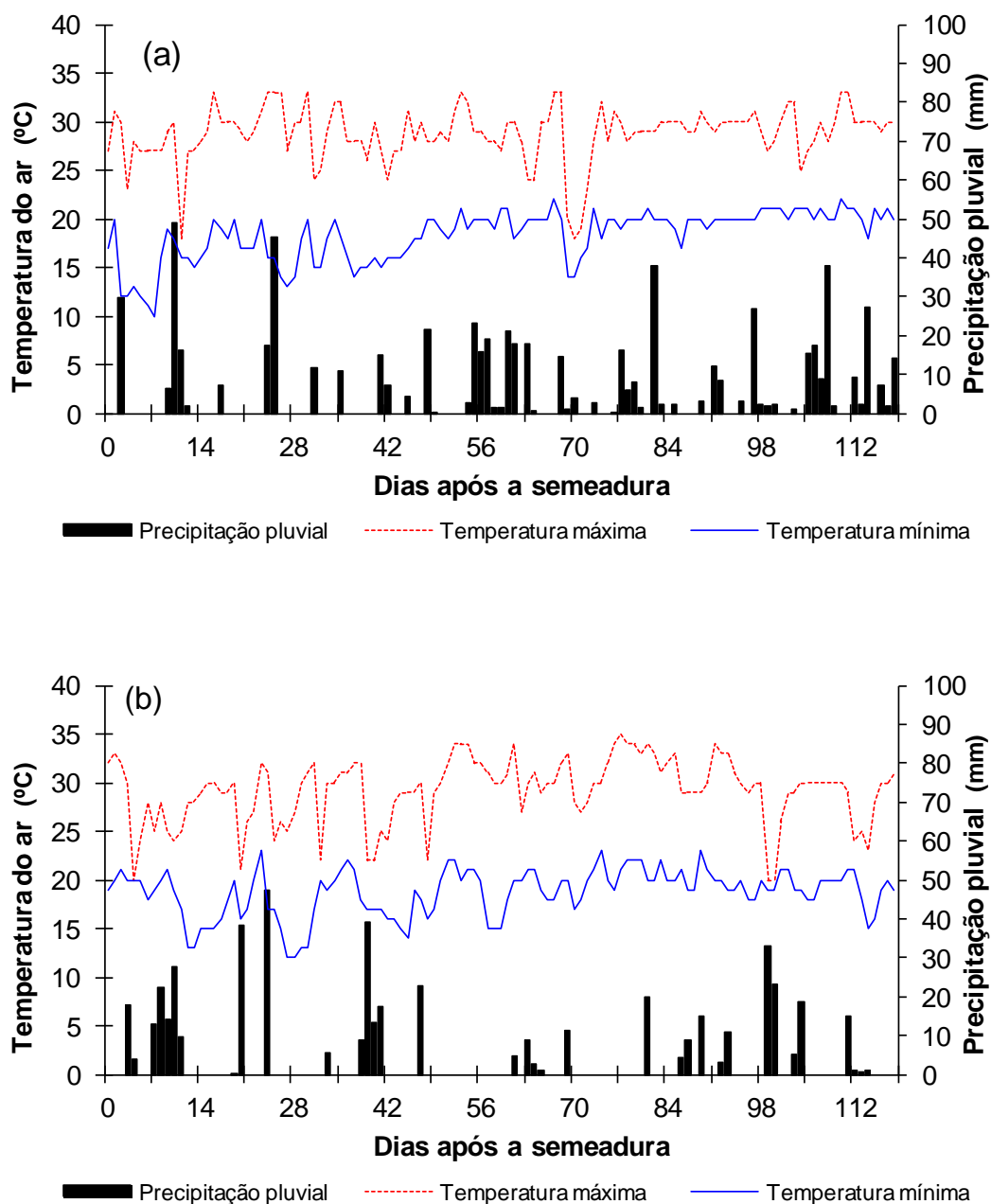


Figura 1. Dados climáticos diários da precipitação pluvial, temperaturas máximas e mínimas ocorridas durante o período experimental para os anos agrícolas 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b).

Com relação ao manejo de pré-semeadura, noventa dias antes da instalação do primeiro experimento realizou-se a calagem do solo, com a aplicação de $1,0 \text{ t ha}^{-1}$ de calcário calcítico (PRNT 85), incorporado ao solo, visando a elevação da saturação por bases acima de 60% (EMBRAPA, 2012).

Na área experimental na safra de inverno era semeado canola e na safra de verão era semeado milho.

A área experimental foi dessecada 10 dias antes com 2,5 L kg⁻¹ do herbicida Glyphosate, associado com 1 L ha⁻¹ de 2,4-D-dimetilamina, mais 0,5 L ha⁻¹ de óleo mineral (EMBRAPA, 2012).

Cada parcela experimental foi constituída por cinco linhas de plantas com 6,0 m de comprimento, espaçadas em 0,9 m. As avaliações foram realizadas nas três linhas centrais, excluindo 0,5 m das extremidades de cada linha, totalizando 13,5 m² de área útil.

Os tratamentos foram constituídos de cinco doses de N (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha⁻¹), na ausência e presença da inoculação das sementes com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, na formulação líquida (Tabela 2), associado à aplicação foliar do biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹), no estágio V₄. O esquema detalhado dos tratamentos encontra-se apresentado na Tabela 3.

O biorregulador líquido é composto por três reguladores vegetais em sua concentração: 90 mg L⁻¹ de cinetina, 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico e 50 mg L⁻¹ de ácido 4-indol-3-ilbutírico (STOLLER DO BRASIL, 1998).

Tabela 2. Características do inoculante utilizado à base de *Azospirillum brasilense*, produto comercial Marterfix Gramíneas Líquido[®], em dois anos agrícolas

Inoculante	Estirpes	Suporte
<i>Azospirillum brasilense</i> ⁽¹⁾	AbV5 e AbV6	Água

(1): Empresa formuladora: Stoller do Brasil Ltda;
Concentração mínima: 2 x 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹;
Aditivos: poliol, ácido carboxílico, estabilizante/conservante e tensoativo;
Densidade: 1 g mL⁻¹;
Natureza física: líquido (suspensão homogênea);
Dose: 200 mL do produto comercial por hectare, veiculado misturado às sementes.

2.1.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental

Análise do número de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo, foram coletadas amostras de solo ao início de cada experimento, com

trato Uhland, esterilizado, à superfície e nas profundidades 0,10 a 0,30 m.

As amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados e enviadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

A contagem de microrganismos diazotróficos para determinação da população de bactérias em n° de células por g, foi realizada por meio da estimativa do Número Mais Provável (NMP) usando a tabela de MacCready em meio semi-sólido NFB (*Azospirillum* spp.) de acordo com metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995).

Tabela 3. Esquema dos tratamentos de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, doses de N associado a biorregulador, em dois anos agrícolas

Inoculação das sementes ¹	Dose de adubação com N	Aplicação foliar de Biorregulador*
Sem <i>Azospirillum brasilense</i>	0,0 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	45 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	90 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	135 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	180 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
Com <i>Azospirillum brasilense</i>	0,0 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	45 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	90 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	135 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)
	180 kg ha ⁻¹	Sem Biorregulador
		Com Biorregulador (V ₄)

(¹): Inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* (200 mL ha⁻¹).

(*): Aplicação foliar no estágio V₄ com o biorregulador na dose de 250 mL ha⁻¹.

A adubação foi realizada mecanicamente de acordo com a extração média de nutrientes pela cultura do milho, com produtividade esperada de 10.000 kg ha⁻¹, considerando os resultados da análise de solo. A adubação de semeadura para os dois anos agrícolas (2010/2011 e 2011/2012) foi realizada

de acordo como descrito por Fornasieri-Filho (2007). Os adubos utilizados na semeadura foram o Sulfato de Amônio (20% de N), Superfosfato Triplo (41% de P_2O_5) e Cloreto de Potássio (60% de K_2O), mediante aplicação de 20, 40 e 80 kg ha^{-1} de N, P_2O_5 e K_2O , respectivamente.

A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada manualmente no estádio V_4 , a lanço, utilizando Sulfato de Amônio $(NH_4)_2SO_4$, até atingir as doses de 0,0, 45, 90, 135 e 180 kg de N ha^{-1} . No estádio V_6 , foi aplicado em cobertura 40 kg de K_2O ha^{-1} , na forma de Cloreto de Potássio.

A inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* foi realizada após o tratamento das sementes com o fungicida Carbendazim + Tiram, na dose de 2,5 mL kg^{-1} sementes, e com o inseticida Imidacloprido + Beta-Ciflutrina, com 300 mL ha^{-1} (EMBRAPA, 2012).

O inoculante com as estirpes AbV5 e AbV6 foi aplicado nas sementes de milho da seguinte forma: após as sementes serem tratadas com o fungicida e inseticida, o inoculante foi veiculado na dose de 200 mL ha^{-1} , a fim de proporcionar o total recobrimento e, posteriormente, realizada a semeadura.

A semeadura foi realizada em área de plantio direto sobre a palhada de aveia nos dias 05/10/2010 e 06/10/2011, com capacidade de campo presente no solo para germinação, em espaçamento de 0,90 m entre as linhas e população de 55.555 plantas ha^{-1} . Foi utilizado o híbrido simples de milho da Pioneer 30F35 YH, que apresentou elevado potencial produtivo (EMBRAPA, 2012).

A aplicação do biorregulador foi realizada no estádio V_4 , na dose de 250 mL ha^{-1} . Para a aplicação foliar, foi utilizado o pulverizador costal propelido a CO_2 , com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), com vazão de 0,65 L min^{-1} equipado com lança contendo 1 bico leque da série Teejet tipo XR 110 02, que, trabalhando a uma altura de 50 cm do alvo e a uma velocidade de 1 m s^{-1} , atingindo uma faixa aplicada de 50 cm de largura, proporcionou volume de calda de 200 L ha^{-1} . As condições climáticas foram adequadas no momento da aplicação, tanto para o ano agrícola de 2010 (83% de UR e temperatura de 26°C) como para 2011 (80% de UR e temperatura de 28°C).

Em relação aos tratos culturais e fitossanitários, quando atingido o nível de dano econômico, foram realizados para o desenvolvimento adequado das plantas do experimento, seguindo as recomendações da Embrapa (2012).

Durante o desenvolvimento da cultura foram realizadas capinas manuais e aplicações do herbicida Atrazina, na dose de 5 L ha⁻¹ e Tembotriona, na dose de 200 mL ha⁻¹.

O controle de pragas e doenças, respeitando o nível de dano econômico segundo as recomendações da Embrapa (2012), foi realizado como manejo integrado, o uso dos seguintes tratamentos: aplicação de Lufenuron a 100 mL ha⁻¹, Triflumuron a 30 mL ha⁻¹ Beta-ciflutrina a 20 mL ha⁻¹, para o controle de vaquinhas; Endossulfan a 1,250 mL ha⁻¹ para o controle de pulgões e percevejos; aplicação de Azoxystrobin + Ciproconazole a 300 mL ha⁻¹, para a prevenção das seguintes doenças: mancha branca, mancha foliar, cercosporiose, ferrugem tropical, podridões do colmo e das raízes, podridões de espiga e grãos ardidos, podridão branca da espiga, podridão de *fusarium*, podridão de *giberela*, grãos ardidos e doenças sistêmicas como o enfezamento (EMBRAPA, 2012).

2.2 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes

As avaliações da qualidade fisiológica das sementes foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e no Laboratório de Físico-química de Sementes, ambos localizados no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (NUPAGRI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da UEM, situada a uma latitude de 23°06' sul e longitude de 51°43' a oeste de Greenwich, com altitude média de 565 m.

Foram avaliadas as seguintes características: teste de germinação (plântulas normais e contagem final), teste de frio modificado e teste de condutividade elétrica.

Teste de germinação: foi realizado com quatro subamostras compostas por 50 sementes para cada tratamento e repetição. Foram colocadas para germinar entre três folhas de papel-toalha embebidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Foram confeccionados rolos, sendo estes levados para um germinador regulado para manter constante a temperatura de 25°C (BRASIL, 2009). As avaliações foram realizadas aos quatro (plântulas normais) e sete dias (contagem final), computando-se a porcentagem de plântulas normais. Foram consideradas plântulas normais as

que apresentavam raiz principal com tamanho superior a 9 cm e parte aérea maior que 5 cm e presença de, no mínimo, 2 raízes seminais. A primeira contagem foi considerada indicativo de vigor e a contagem final o percentual total de germinação das sementes.

Teste de frio modificado: foi realizado com quatro subamostras compostas por 50 sementes para cada tratamento e repetição. Como substrato, foram utilizadas três folhas de papel-toalha umedecidas com água destilada. Após a semeadura, confeccionaram-se rolos, sendo estes envoltos por sacos plásticos e lacrados com fita adesiva, permanecendo nessa condição por um período de sete dias em uma câmara de germinação, regulada à temperatura constante de 10°C. Em seguida, os rolos foram levados para um germinador regulado para manter constante a temperatura de 25°C, durante quatro dias, procedendo-se, em seguida, a avaliação (BARROS et al., 1999). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas na data de avaliação, segundo os mesmos critérios adotados para o teste de germinação (BRASIL, 2009).

Condutividade elétrica: foi conduzida utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento e repetição. Inicialmente, as amostras foram pesadas e colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada sendo, então, levadas para uma estufa incubadora regulada à temperatura de 25°C, por um período de 24 h. Ao final desse período efetuou-se a leitura da condutividade elétrica na solução de embebição, utilizando-se um condutímetro microprocessado digital de bancada, modelo ACA 150, da marca Alpax. Previamente à leitura, a solução de embebição foi levemente agitada com o auxílio de um bastão de vidro. O eletrodo do aparelho foi lavado em água desmineralizada e seco com papel-toalha antes de cada medição. O valor indicado pelo aparelho foi anotado e dividido pela massa obtida de cada subamostra. Desse modo, o resultado obtido foi expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

2.3 Avaliação da composição química das sementes

As avaliações da composição química das sementes foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e no Laboratório de Físico-química

de Sementes, ambos localizados no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (NUPAGRI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da UEM.

Foram avaliadas as seguintes características: conteúdo de óleo e conteúdo de proteína e nitrogênio nas sementes.

Determinação de óleo: para avaliação dos lipídios totais (óleo), utilizou-se o aparelho extrator de Soxhlet e éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (I.A.L., 1985), com refluxo de 6h. Foram avaliadas quatro subamostras de 2 g de cada repetição de campo, provenientes de sementes previamente moídas. Os resultados foram expressos em gramas por Kilograma (g kg^{-1}) de óleo extraído, determinado por diferença de pesagem.

Determinação de proteínas e nitrogênio: foi realizada utilizando-se o método de Kjeldahl, na quantificação de nitrogênio total, conforme recomendação da Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C., 1990) e Vitti et al. (2001), com modificações. Foram analisadas quatro subamostras de 0,2 g da farinha de milho moída, provenientes de amostras de sementes de cada repetição de campo. O milho moído foi condicionado em tubos de ensaio, junto com 2 g de uma mistura catalítica (sulfato de cobre e selênio em pó) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado; estes tubos foram, posteriormente, levados para aquecimento em um bloco digestor para a fase de digestão da matéria orgânica. O aquecimento foi gradual e, assim que a temperatura de 350°C foi atingida, o material permaneceu a esta temperatura constante por mais 2,5 h. Após a obtenção do material digerido, iniciou-se a fase de destilação da amônia liberada, após a reação com hidróxido de sódio (50%), sendo recolhida em solução de ácido bórico a 4%. A titulação foi realizada em solução-padrão de ácido clorídrico a 1 N, em que os indicadores foram o vermelho de metila (0,2%) e o azul de metila (0,2%). Obteve-se para esse procedimento a recuperação de 99,7% do nitrogênio. Para o cálculo da conversão de nitrogênio em proteínas, foi utilizado o fator 6,25 e a porcentagem de proteínas foi obtida com base na massa seca.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial com seis repetições de campo. Os tratamentos constituíram-se da ausência e presença da inoculação das sementes com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, cinco doses de nitrogênio (0,0, 45, 90, 135 e 180 kg ha⁻¹) aplicado na base e em cobertura, além do manejo com a aplicação foliar do biorregulador (0,0 e 250 mL ha⁻¹), no estádio V₄. Os referidos tratamentos foram arranjados em esquema fatorial (2 x 5 x 2).

Os dados experimentais, de cada um dos anos agrícolas, foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965) ($P > 0,01$) e de Levene (BOX, 1953) ($P > 0,01$), para verificação da normalidade e homocedasticidade residuais, respectivamente, mediante emprego do software estatístico SAS (EVERITT, 2001). Posteriormente, atendidas essas pressuposições, de modo individual em cada experimento, realizou-se a análise de variância ($P < 0,05$) (STEEL; TORRIE, 1960), por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

Na análise conjunta dos dados para os dois anos agrícolas, procederam-se a verificação da magnitude dos quadrados médios residuais das análises individuais, conforme Pimentel Gomes (1990). Com isso, avaliaram-se as variâncias residuais e a relação entre quadrados médios residuais, das análises de variância individuais, para uma determinada variável resposta na qual não ultrapassou a relação de 7:1, estabelecida por Banzatto e Kronka (1989).

Após a verificação da homogeneidade das variâncias dos resíduos, na análise conjunta dos experimentos, procedeu-se aos desdobramentos que se apresentaram significativos. Os efeitos das doses de N aplicadas em cobertura foram estudados mediante análise de regressão polinomial, observando-se os resultados do teste F ($P < 0,05$) da análise de variância ($P < 0,05$) e os coeficientes de determinação (CRUZ; REGAZZI, 2001).

A avaliação dos efeitos da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, manejo com aplicação foliares do biorregulador e dois anos agrícolas foi utilizado o teste F, pois, para dois níveis de fatores, o mesmo é conclusivo (BANZATTO; KRONKA 1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental, para o primeiro ano agrícola foi $7,4 \times 10^1$ NMP g^{-1} . Já, para o segundo ano agrícola foi $7,1 \times 10^1$ NMP g^{-1} . Essas diferenças na sobrevivência das bactérias diazotróficas devem ter sido influenciadas pelas condições ambientais.

Em relação às sementes obtidas nas 120 parcelas, para os dois anos agrícolas, estas apresentaram conteúdo de água inicial entre 10,4 e 12,6%. Com isso, essas variações estavam dentro dos limites toleráveis, não afetando o comportamento das sementes durante a condução dos testes de laboratório e contribuindo para a obtenção de resultados mais consistentes (TEKRONY, 2003).

O resumo da análise de variância para a qualidade fisiológica das sementes de milho encontra-se na Tabela 4. Nota-se, que para o fator principal doses de nitrogênio, houve efeito significativo ($P < 0,05$) para a contagem de plântulas normais e contagem final da germinação, frio modificado e condutividade elétrica.

Em relação à variável resposta contagem final, também houve diferenças significativas para os anos agrícolas, inoculação com *Azospirillum* e para a interação anos agrícolas x doses de N. Esse comportamento também se assemelhou na variável condutividade elétrica, que incluiu diferenças significativas para fator principal biorregulador e para as interações anos agrícolas x *Azospirillum* e anos agrícolas x *Azospirillum* x biorregulador.

A interação quádrupla dos fatores anos agrícolas, *Azospirillum*, doses de nitrogênio e biorregulador foram não significativas. No entanto, foram realizados os devidos desdobramentos para verificar possíveis diferenças significativas.

Não obtendo diferenças significativas para os desdobramentos de interação quádrupla, foi necessário realizar o desdobramento das interações triplas e assim sucessivamente.

Tabela 4. Resumo da análise de variância conjunta, referente às variáveis respostas: plântulas normais (P.N), contagem final (C.F), teste de frio modificado (F.M) e condutividade elétrica (C.E), em função da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas

F.V ¹	G.L ²	Quadrados médios			
		P.N	C.F	F.M	C.E
A. a	1	31,537 ^{ns}	1798,538*	1869,523 ^{ns}	44,807*
A	1	30,816 ^{ns}	180,266*	41,783 ^{ns}	38,064*
D	4	95,695*	229,667*	62,515*	29,739*
B	1	12,150 ^{ns}	10,837 ^{ns}	2,637 ^{ns}	19,244*
A.a x A	1	68,266 ^{ns}	61,004 ^{ns}	27,432 ^{ns}	33,271*
A.a x D	4	36,930 ^{ns}	142,360*	12,778 ^{ns}	2,844 ^{ns}
A.a x B	1	2,400 ^{ns}	4,816 ^{ns}	3,229 ^{ns}	0,369 ^{ns}
A x D	4	28,288 ^{ns}	9,985 ^{ns}	5,761 ^{ns}	0,809 ^{ns}
A x B	1	7,000 ^{ns}	5,704 ^{ns}	0,651 ^{ns}	1,201 ^{ns}
D x B	4	2,428 ^{ns}	8,160 ^{ns}	16,664 ^{ns}	0,949 ^{ns}
A.a x A x D	4	14,092 ^{ns}	15,123 ^{ns}	29,822 ^{ns}	1,469 ^{ns}
A.a x A x B	1	13,537 ^{ns}	16,016 ^{ns}	5,551 ^{ns}	12,114*
A.a x D x B	4	2,76 ^{ns}	7,394 ^{ns}	14,375 ^{ns}	0,691 ^{ns}
A x D x B	4	19,350 ^{ns}	23,834 ^{ns}	19,607 ^{ns}	0,198 ^{ns}
A.a x A x D x B	4	43,415 ^{ns}	17,464 ^{ns}	17,851 ^{ns}	1,108 ^{ns}
Blocos/Anos	10	62,100	64,172	119,212	7,060
Resíduo	190	22,488	29,974	18,595	2,830
Total	239				
Média Geral		77,60	85,24	84,05	13,84
C.V ³ (%)		6,11	6,42	5,13	12,17

(¹): Fontes de Variação; Aa = Anos agrícolas; D = Doses de N; A = *Azospirillum brasilense*; B = Biorregulador; (²): G.L: Graus de Liberdade; (*): Significativo pelo teste "F" a 5% de probabilidade; (^{ns}): não-significativo; (³): coeficiente de variação.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados médios da primeira contagem do teste de germinação, em função das doses de nitrogênio. As doses N proporcionaram o ajuste da seguinte equação de regressão: $\hat{Y} = 75,615 + 0,0546X - 0,0002X^2$, com R² de 0,74. Neste caso, houve um acréscimo no vigor das sementes com o aumento da dose de N, seguido de um

decréscimo a partir da dose de 113,81 kg ha⁻¹ de N (ponto de máximo), gerando modelo quadrático.

Houve tendência crescente no vigor das sementes a partir da dose zero de N, chegando ao máximo da função de 78,72%. Após atingir esse ponto, o vigor começou a diminuir, conforme o aumento das doses de nitrogênio. Esse comportamento foi semelhante aos resultados do vigor das sementes obtidos no teste de frio modificado (Figura 4).

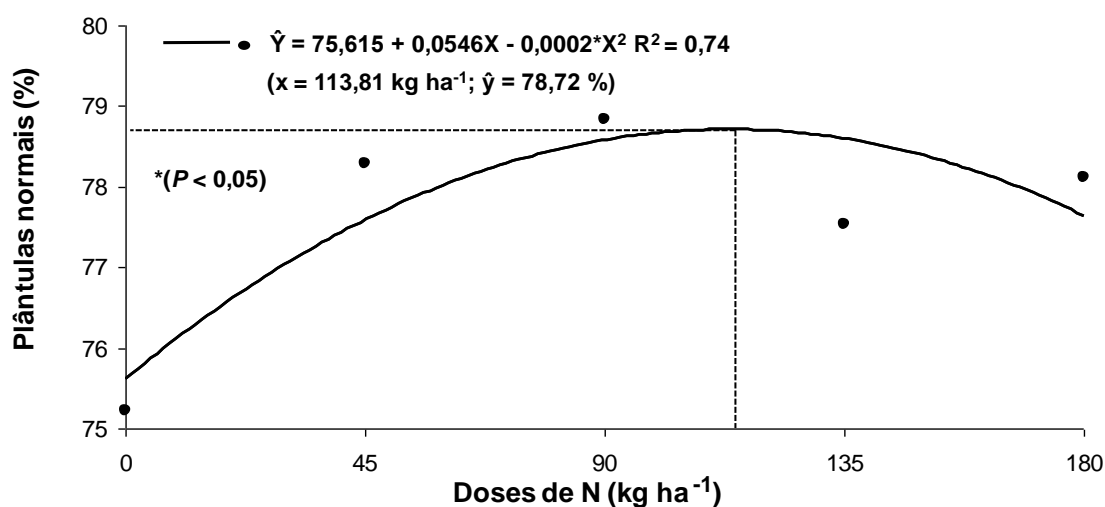


Figura 2. Regressão polinomial para a porcentagem de plântulas normais teste de germinação das sementes de milho, em resposta adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

De acordo com os resultados da Figura 2, é provável que adubação nitrogenada tenha influenciado positivamente a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem da germinação, até a dose de 113,81 kg ha⁻¹ de N. Assim, verifica-se que as amostras com baixo vigor, ou seja, que receberam as maiores doses de N, apresentaram queda no potencial fisiológico, quando submetidas às condições do teste, enquanto as mais vigorosas, geralmente, são menos afetadas em sua capacidade de produzir plântulas normais pelas doses de nitrogênio. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), a disponibilidade de nutrientes interfere na formação e composição química das sementes, afetando o seu metabolismo e vigor.

Neste caso, quando há excessivo fornecimento de nitrogênio, a planta aumenta a síntese de proteínas e a formação de novos tecidos, usando a maior parte dos carboidratos na síntese de aminoácidos (IMOLESI et al., 2001).

Estes resultados se assemelham com aqueles obtidos por Farinelli et al. (2006), em sementes de feijão, os quais observaram que a adubação nitrogenada em cobertura promoveu acréscimos no vigor das sementes, com o ajuste de equação quadrática.

Efeitos positivos da aplicação de nitrogênio na qualidade fisiológica das sementes foram relatados para a cultura do milho por Bono et al. (2008). Da mesma forma, Abrantes et al. (2010) obtiveram resultados positivos da aplicação de nitrogênio no aumento do vigor das sementes de painço.

Nesse sentido, Crusciol et al. (2003), trabalhando com feijão e Schuch et al. (1999), com aveia preta, ao avaliarem o efeito da aplicação de N no vigor das sementes, constataram que a porcentagem de plântulas na primeira contagem foi menor, quando realizaram a adubação nitrogenada. Silva et al. (2001), ao avaliarem dosagens e épocas de aplicação de N e Nakagawa et al. (2000), ao avaliarem doses de N em cobertura, ambos os experimentos com sementes de aveia, constaram que não houve efeito sobre o vigor das sementes com o aumento da adubação nitrogenada.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da contagem final do teste de germinação entre os dois agrícolas, na ausência e presença do inoculante aplicado via sementes.

Para a contagem final (Tabela 5), observou-se incremento significativo na germinação das sementes para o ano agrícola 2010/2011. O menor valor na contagem final do teste de germinação foi observado ano agrícola 2011/2012, provavelmente relacionado à condição edafoclimática, como a falta de chuvas (Figura 1 entre os dias 56 a 70) durante o período da polinização (fase crítica), ocorrência de temperaturas elevadas, acima de 35°C, retenção e manutenção da umidade do solo, nível de fertilidade inicial do solo e elevadas precipitações na maturação fisiológica, favorecendo a deterioração, e conseqüentemente, afetando a qualidade fisiológica das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MEIRELES et al., 2009; TOLEDO et al., 2009).

Os resultados distintos observados entre os anos agrícolas podem ser explicados pela influência do ambiente na qualidade fisiológica das sementes

de milho, conforme observado por Krzyzanowski et al. (2008), Albrecht et al. (2010) e Minuzzi et al. (2010), porém com outras culturas.

Segundo Bewley e Black (1994), a redução na germinação das sementes também pode ser atribuída a menor mobilização das reservas, menor síntese e atividade enzimática ou mudanças na turgescência celular.

Na ausência do inoculante (Tabela 5), as sementes de milho apresentaram menor porcentagem de germinação, com 81,10%. O incremento na porcentagem de germinação pode estar relacionado com a maior disponibilidade de nitrogênio proporcionada pela *Azospirillum brasilense*. Neste sentido, é provável que a liberação lenta e gradativa do N fixado pelas bactérias diazotróficas possam auxiliar a formação do embrião e dos órgãos de reserva da semente.

Tabela 5. Resultados médios da contagem final do teste de germinação de sementes de milho entre os anos agrícolas e não inoculado e inoculado em dois anos agrícolas

	2010/2011	2011/2012
Anos agrícolas	87,97 A	82,50 B
Inoculante	Não inoculado	Inoculado
	81,10 B	84,37 A
C.V %	6,42	

Letras maiúsculas iguais na linha, entre ausência e presença do inoculante e entre os anos agrícolas, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Segundo Huergo et al. (2008), além das bactérias diazotróficas se destacarem por sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, também podem estimular o crescimento das plantas, por meio da produção de fitohormônios, de forma a permitir seu bom desenvolvimento.

Os resultados da inoculação das sementes com bactérias do gênero *Azospirillum* spp. são variáveis e apresentam efeitos significativos sobre a qualidade fisiológica das sementes (LEE et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010).

Por isso, é necessário à adoção de novas técnicas que proporcionem a produção de sementes com maior potencial fisiológico. Segundo França-Neto, Krzyzanowski e Henning (2011), o uso de sementes vigorosas assegura o

estabelecimento de uma população adequada de plantas, mesmo em condições estressantes.

Na Figura 3 são apresentados os resultados referentes à regressão polinomial com comportamento linear crescente do tratamento quantitativo doses de nitrogênio para a variável contagem final do teste de germinação. Observa-se que houve efeito positivo do N na contagem final da germinação. Porém, a resposta ocorreu independentemente da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, da aplicação de biorregulador e dos anos agrícolas avaliados. Dessa forma, é provável que o aumento na porcentagem de germinação, em função de doses de nitrogênio se deva, provavelmente, ao fato deste nutriente estar relacionado à formação do embrião e dos órgãos de reserva (CARVALHO; NACAGAWA, 2000).

Diante desses resultados, supõe-se que com a maior disponibilidade de nitrogênio possa ocorrer acréscimo na produção sucessiva de inúmeras proteínas modificadoras de parede celular, incluindo endo- β -1,4-mananase e endo- β -1,3-glucanase, promovendo incremento na porcentagem de germinação (BEWLEY, 1997; BAILLY, 2004; KUCERA et al., 2005).

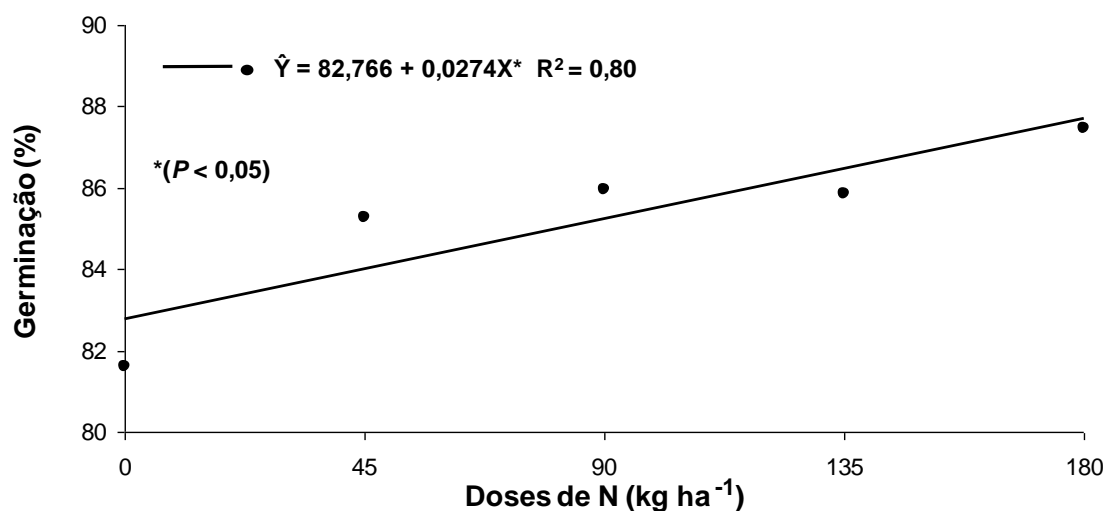


Figura 3. Regressão polinomial da germinação de sementes de milho, em resposta ao aumento da adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

A maior disponibilidade de nitrogênio altera a composição bioquímica das sementes. Nesse caso, as sementes seriam capazes de embeber água mais rapidamente para iniciar a cadeia de reações enzimáticas necessárias para converter materiais de reserva em formas capazes de iniciar a germinação (BEWLEY, 1997; BAILLY, 2004).

Na Figura 4, observa-se o comportamento quadrático obtido para variável teste de frio modificado, em função das doses de nitrogênio aplicadas, independentemente da inoculação das sementes, aplicação foliar de biorregulador e anos agrícolas. A derivada da equação permitiu obter um ponto de máximo de 113,61 kg ha⁻¹ de N, no qual a resposta máxima foi de 84,88% de plantas normais no referido teste, ou seja, o ponto em que foi obtido o melhor vigor das sementes, em respostas às diferentes doses.

Menciona-se o fato de que algumas das respostas favoráveis ao uso da adubação nitrogenada tenham ocorrido quando as aplicações foram realizadas próximo a dose de 114 kg ha⁻¹ de N, em ambos anos agrícolas. Em relação à qualidade fisiológica, é pertinente ressaltar que a contagem final da germinação apresentou comportamento linear, ao passo que as variáveis indicadoras do vigor caracterizaram comportamento quadrático.

Os resultados obtidos por outros autores, tais como Zucarelli et al. (2012), relatam que a aplicação de nitrogênio no estágio vegetativo favorece o vigor das sementes de milho doce. Da mesma forma, Lopes et al. (2004), trabalhando com composto orgânico e aplicação de nitrogênio, obtiveram sementes mais pesadas, maiores e mais vigorosas.

De acordo com os resultados obtidos, é provável que a produtividade e a qualidade fisiológica das sementes possam ser influenciadas pela disponibilidade e o equilíbrio do nitrogênio no solo.

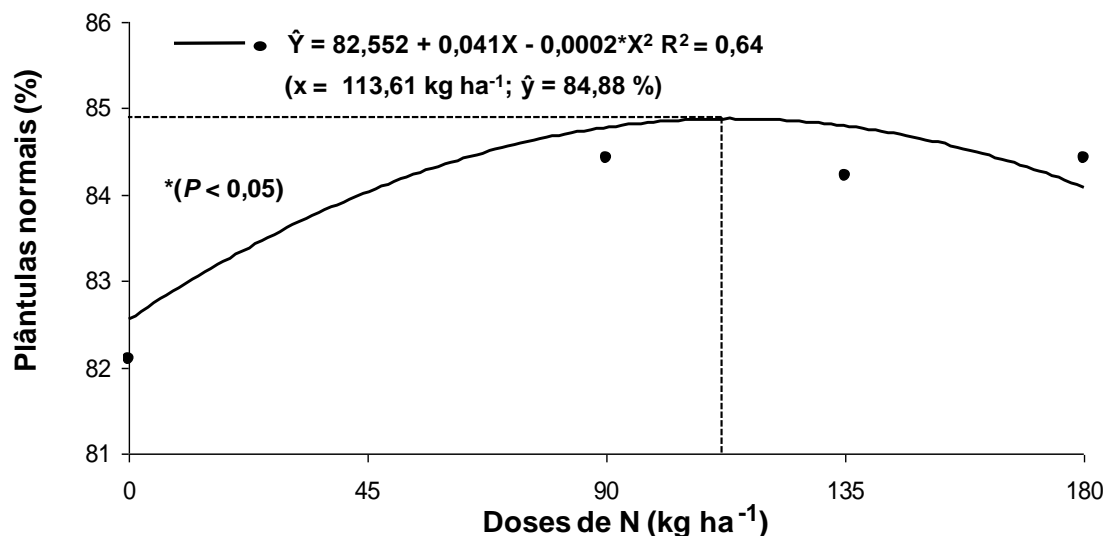


Figura 4. Regressão polinomial da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de frio modificado das sementes de milho, em resposta a adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Por outro lado, ressalta-se que a aplicação demasiada de nitrogênio, promove decréscimo no vigor das sementes, conforme observado na dose de 180 kg ha⁻¹ de N (Figura 4).

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados referentes ao desdobramento dos anos agrícolas dentro de cada nível de *Azospirillum* e biorregulador, para a variável resposta condutividade elétrica das sementes de milho. Verifica-se, de forma geral, para o ano agrícola 2010/2011 que a inoculação das sementes não apresentou relação direta com o vigor. Para o ano agrícola 2011/2012, a presença da *Azospirillum brasilense* proporcionou incremento significativo no vigor das sementes, com valores mais baixos de condutividade elétrica, ou seja, 12,81 e 12,47 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente na ausência e presença do biorregulador. Para o ano agrícola 2010/2011, durante o período de maturação fisiológica, as sementes foram expostas a maior precipitação pluvial, o que pode ter influenciado na transferência de matéria seca para as sementes e comprometido a integridade das membranas celulares e a deposição de reservas (BEWLEY; BLACK, 1994).

Esse resultado não se correlacionou com os demais testes de vigor, pois a inoculação com *Azospirillum brasilense* não influenciou significativamente a qualidade fisiológica das sementes.

Com relação à aplicação do biorregulador (Tabela 6), tanto para o ano agrícola 2010/2011, quanto para o ano agrícola 2011/2012, independentemente das doses de nitrogênio, o biorregulador não proporcionou incrementos no potencial fisiológico das sementes. Neste caso, é possível afirmar que com a capacidade da *Azospirillum brasilense* em produzir pequenas quantidades de hormônios como auxinas, citocininas, giberilinas e menor quantidade de etileno, possa ter inibido a ação do biorregulador no incremento da qualidade fisiológica das sementes de milho (ABBSI et al., 2011; FISCHER et al., 2007; STRZELCZYK et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 2004; BASHAN et al., 2004).

Por outro lado, podem agir indiretamente no crescimento como indutor de resistência, protegendo a planta de fungos do solo ou de bactérias fitopatogênicas, com a produção de sideróforos, chitinases, glucanases e antibiose (SPAEPEN et al., 2007; EMBRAPA, 2007; PERRIG et al., 2007; CASSÁN; GARCIA, 2008; REIS JUNIOR et al., 2008; WHIPPS, 2001; BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

Tabela 6. Resultados médios do teste de condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) das sementes de milho na análise do desdobramento de anos agrícolas dentro de cada nível de *Azospirillum* e biorregulador, em dois anos agrícolas

F.V ¹	2010/2011		2011/2012	
	Aus. Bio ²	Pres. Bio ³	Aus. Bio ²	Pres. Bio ³
Não inoculado	14,25 Aa	14,35 Aa	14,66 Bb	13,70 Ab
Inoculado	14,79 Bb	13,71 Aa	12,81 Aa	12,47 Aa
C.V (%)	12,17			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste F. (1): fontes de variação; (2): Ausência de biorregulador; (3): Presença de biorregulador.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Moterle et al. (2011). Os autores verificaram que doses crescentes do biorregulador não

influenciaram a germinação das sementes e a biomassa seca das plântulas. Contudo, aumentou a velocidade de germinação nas sementes de soja. Por outro lado, Ávila et al. (2008) e Albrecht (2010) obtiveram resultados positivos na qualidade das sementes de soja produzidas em manejo com biorregulador.

Campos et al. (2008) e Campos et al. (2009), trabalhando com o mesmo produto, ou com outros reguladores aplicados exogenamente, obtiveram produção de sementes com potencial fisiológico diferenciado.

Na Figura 5 são apresentados os resultados da análise de regressão para a variável condutividade elétrica das sementes de milho. Observa-se que os maiores valores de condutividade elétrica, o que indica sementes menos vigorosas, ocorreram nas menores doses de nitrogênio.

Diante dos resultados mencionados (Figura 5), é provável que a adubação nitrogenada possa influenciar o processo de maturação, proporcionando um processo mais lento na solidificação do endosperma leitoso, devido à conversão da sacarose em amido, e, com isso, proporcionando sementes mais vigorosas.

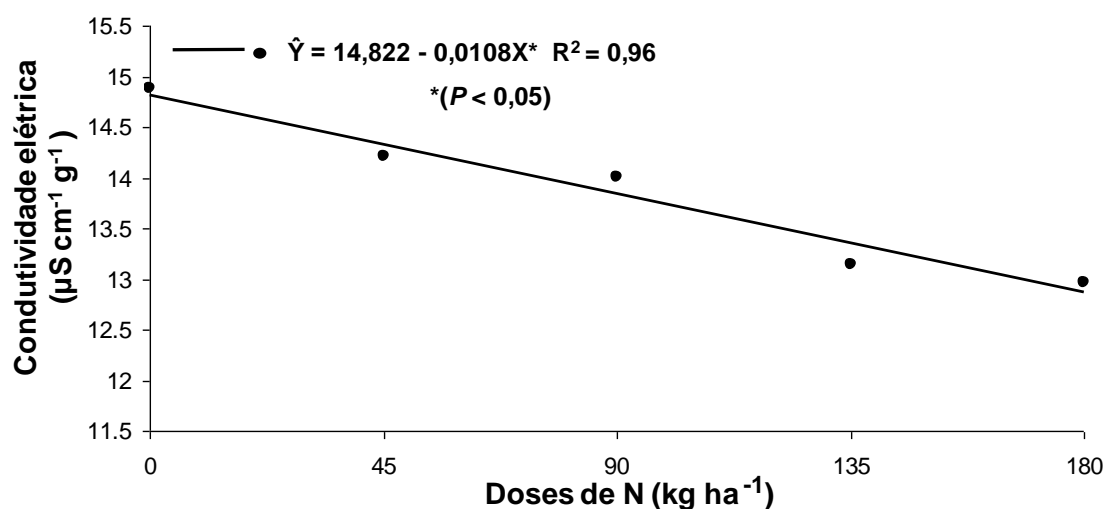


Figura 5. Regressão polinomial da condutividade elétrica das sementes de milho, em resposta a adubação nitrogenada, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Com o aumento da adubação nitrogenada houve uma redução na condutividade elétrica, de acordo com o ajuste da equação linear $\hat{Y} = 14,822 - 0,0108X$, $R^2 = 0,96$, apresentando valores de $14,336 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ com aplicação de 45 kg ha^{-1} de N. Nesse caso, observa-se que houve redução de $0,486 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ na condutividade elétrica das sementes de milho para cada 45 kg ha^{-1} de N aplicado.

Por meio dos resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica (Figura 5), observou-se que vigor das sementes de milho aumenta linearmente com o decréscimo da condutividade elétrica proporcionado pela elevação das doses de nitrogênio. Esse comportamento foi diferente dos demais testes de vigor (plântulas normais e teste de frio modificado).

Com a maior disponibilidade de nitrogênio para planta, é possível explicar que a redução dos valores de condutividade elétrica esteja relacionada com o desenvolvimento e a organização estrutural das membranas celulares, o que proporciona a redução nos valores de condutividade elétrica (HOEKSTRA et al., 1999).

Na análise de variância conjunta para o conteúdo de óleo, verificou-se significância para o fator anos agrícolas, *Azospirillum* e doses de N, assim como para a interação entre anos agrícolas x *Azospirillum*, anos agrícolas x dose e anos agrícolas x *Azospirillum* x dose x biorregulador, enquanto que os demais fatores e interações não foram significativos (Tabela 7). Para a variável conteúdo de proteína e nitrogênio nas sementes, as mesmas foram significativas para os anos agrícolas e doses de nitrogênio.

Embora o desdobramento da terceira ordem não tenha sido significativo para o conteúdo de proteína e nitrogênio foi obtido equação de regressão significativa, que explica o comportamento do conteúdo de óleo, em função do aumento das doses de N (Figura 6, 7 e 8).

A distribuição do N acumulado na parte aérea do milho comum é de 64% do N 50 translocado para os grãos e 36% se mantém na parte aérea do milho (SILVA et al., 2006), evidenciando que o maior dreno de N na planta são os grãos, e que grande quantidade de N das partes vegetativas é translocada para os grãos, passando a fazer parte da constituição de aminoácidos e proteínas (MARSCHNER, 2011).

Tabela 7. Resumo da análise de variância conjunta, referente às variáveis respostas: conteúdo de óleo, proteína e nitrogênio nas sementes de milho, em função da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, doses de N e biorregulador, em dois anos agrícolas

F.V ¹	G.L ²	Quadrados médios		
		Óleo (g kg ⁻¹)	Proteína (%)	Nitrogênio (%)
Anos agrícolas (A.a)	1	189,730*	359,439*	9,688*
Azospirillum spp. (A)	1	23,845*	1,458 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Doses de N (D)	4	30,292*	24,436*	0,501*
Biorregulador (B)	1	0,010 ^{ns}	0,386 ^{ns}	0,000 ^{ns}
A.a x A	1	12,792*	1,222 ^{ns}	0,094 ^{ns}
A.a x D	4	23,130*	2,227 ^{ns}	0,055 ^{ns}
A.a x B	1	0,180 ^{ns}	0,173 ^{ns}	0,020 ^{ns}
A x D	4	0,662 ^{ns}	1,224 ^{ns}	0,028 ^{ns}
A x B	1	0,567 ^{ns}	1,989 ^{ns}	0,008 ^{ns}
D x B	4	1,300 ^{ns}	2,058 ^{ns}	0,080 ^{ns}
A.a x A x D	4	0,800 ^{ns}	1,908 ^{ns}	0,046 ^{ns}
A.a x A x B	1	0,429 ^{ns}	0,557 ^{ns}	0,000 ^{ns}
A.a x D x B	4	1,851 ^{ns}	0,860 ^{ns}	0,0517 ^{ns}
A x D x B	4	2,698 ^{ns}	0,267 ^{ns}	0,017 ^{ns}
A.a x A x D x B	4	3,369*	0,837 ^{ns}	0,030 ^{ns}
Blocos/Anos	10	4,079	3,007	0,068
Resíduo	190	1,352	2,227	0,066
Total	239			
Média Geral		5,58	8,77	1,40
C.V ³ (%)		20,81	17,02	18,28

(¹): Fontes de Variação; (²): G.L: Graus de Liberdade; (*): Significativo pelo teste "F" a 5% de probabilidade; (^{ns}): não-significativo; (³): Coeficiente de variação.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados do conteúdo de óleo na análise do desdobramento dos anos agrícolas, dentro de cada nível de *Azospirillum*. Para o ano agrícola 2010/2011, independentemente da aplicação de biorregulador e das doses de nitrogênio, a inoculação com a *Azospirillum brasilense* não promoveu acréscimos no conteúdo de óleo. Para o ano agrícola 2011/2012, na presença da inoculação das sementes com *Azospirillum*, houve acréscimo no conteúdo de óleo de 1,09 g kg⁻¹.

Além disso, independentemente da inoculação das sementes, das doses de nitrogênio e da aplicação de biorregulador, o ano agrícola 2010/2011

permitiu maior acúmulo de óleo nas sementes, quando comparado com o ano agrícola seguinte. Este resultado está fortemente ligado com as condições climáticas mais favoráveis para o primeiro ano agrícola como a maior precipitação pluvial (Figura 1).

De acordo com Rao et al. (1993) e Ávila et al. (2007), os fatores genéticos também podem governar, a princípio, os conteúdos de óleo e proteínas nas sementes, porém, estes são fortemente influenciados pelo ambiente, principalmente durante o período de enchimento dos grãos.

O conteúdo de óleo nas sementes pode variar de acordo com o genótipo e com as condições de armazenamento, em especial da temperatura e umidade relativa (KOUTROUBAS et al., 2000).

Tabela 8. Conteúdo de óleo nas sementes de milho, em g kg⁻¹, na análise do desdobramento de anos agrícolas, dentro de cada nível de *Azospirillum*

F.V ¹	2010/2011	2011/2012
Não inoculado	6,39 Aa	4,15 Bb
Inoculado	6,56 Aa	5,24 Ba
C.V (%)	20,81	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste F. (¹): fontes de variação.

Em 2010/2011, o conteúdo de óleo nas sementes apresentou acréscimo linear, em função das doses de nitrogênio. Para cada 45 kg ha⁻¹ de N aplicado houve acréscimo significativo de 0,8955 g kg⁻¹ (Figura 6). Já para o ano agrícola 2011/2012, houve menor incremento linear, na ordem de 0,1530 g kg⁻¹ para cada 45 kg ha⁻¹ de N aplicado (Figura 6). Estes resultados não corroboram com Duarte et al. (2005), os quais não verificaram correlação entre produtividade e conteúdo de óleo nos grãos de milho, em estudo sobre híbridos e adubação nitrogenada.

Em estudo desenvolvido por Darte, Carvalho e Cavichioli (2008), os autores relataram que o conteúdo de óleo (38 a 60 g kg⁻¹) está relacionado com a densidade de grãos.

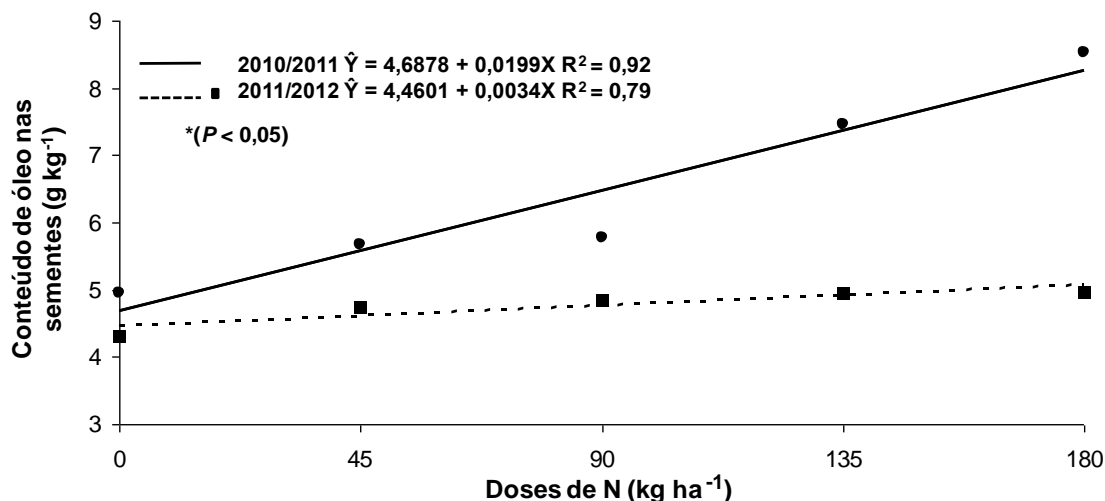


Figura 6. Regressão polinomial para o conteúdo de óleo nas sementes de milho, em função das doses de nitrogênio, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Em relação à adubação nitrogenada, é provável que a maior disponibilidade de nitrogênio esteja relacionada com a maior eficiência metabólica na transformação de açúcar em óleo do que em amido (MILLER et al., 1981). Além disso, supõe-se que as melhores condições climáticas para o ano agrícola 2010/2011 (Figura 1) e a maior disponibilidade de nitrogênio possa ter favorecido a menor peroxidação de lipídios, os quais são constituintes de membranas, cuja degradação aumenta a desorganização do sistema de endomembranas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Altas temperaturas durante o desenvolvimento das sementes estão associadas com a redução no conteúdo de óleo total, porém, em condições campo, este efeito é variável de acordo com outros fatores ambientais, tais como o estresse hídrico, que influencia na produção de óleo, por meio de seus efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento da semente (HARRIS et al., 1978).

Logo, as mudanças no clima e na composição atmosférica podem interferir no comportamento da cultura do milho, aumentando ou diminuindo a quantidade e a qualidade das sementes colhidas, influenciando nos principais componentes da semente, principalmente nos conteúdos de óleo e proteína.

Marschner (2011) sugere que o nitrogênio absorvido pelas plantas pode combinar-se com esqueletos carbônicos, para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais e, por ocasião da fase de enchimento de grãos, estas reservas são metabolizadas, translocadas e armazenadas nestes órgãos, na forma de proteínas e aminoácidos.

Na Figura 7 encontram-se os resultados do conteúdo de proteína, em função das doses de nitrogênio aplicadas, independentemente dos anos agrícolas, inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação do biorregulador. Esses resultados revelaram comportamento quadrático na porcentagem de proteína nas sementes, em função do aumento na dose de nitrogênio. Houve acréscimo até a dose de 125,47 kg ha⁻¹ de N (ponto de máximo), em que se obteve o máximo conteúdo de proteína (9,33%), ocorrendo posterior redução até a dose de 180 kg ha⁻¹ de N. Esta resposta pode estar associada a menor produção de aminoácidos essenciais como lisina e triptofano.

Aproximadamente 80% das proteínas dos grãos de milho estão no endosperma e 20% no embrião. As proteínas predominantes no embrião (albuminas) são de alto valor biológico, enquanto que aquelas predominantes no endosperma (prolaminas, chamadas zeínas no milho) têm baixo valor biológico, devido ao desequilíbrio de aminoácidos essenciais provocado pelo elevado conteúdo de leucina e pela deficiência em lisina e triptofano (VASAL, 1994).

O nitrogênio absorvido pelas plantas combina com esqueletos carbônicos para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais. Por ocasião da fase de enchimento de grãos, estas reservas são quebradas, translocadas e armazenadas nestes órgãos, na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 2011).

Uribelarrea et al. (2004) constataram que adubação nitrogenada estimulou a maior síntese de proteínas e que os conteúdos de proteína e óleo tiveram uma correlação positiva.

Munamava et al. (2002) verificaram que, além dos benefícios relacionados com a alimentação ou utilização dos alimentos, a elevação no

conteúdo de proteína é vantajosa, pois está relacionada com a qualidade fisiológica das sementes.

Okumura, et al. (2014) com as aplicações crescentes de N em cobertura, obtiveram incremento linear no conteúdo de proteína nos grãos de milho doce obtendo melhoria na composição química de grãos de milho doce.

O nitrogênio exerce importantes funções no metabolismo vegetal. É integrante de todos os aminoácidos, fazendo parte da constituição de proteínas (80 a 85% do N total) (TAIZ; ZEIGER, 2013). Geus, Goggi e Pollak (2008) avaliaram a qualidade das sementes de linhagens de milho com elevados conteúdos de proteína, em diferentes sistemas agrícolas, em doses elevadas de nitrogênio e não obtiveram aumento no conteúdo de proteína ou óleo.

Ferreira et al. (2001) observaram que, para as doses de N aplicadas (0,0, 70, 140 e 210 kg ha⁻¹ de N), o conteúdo de proteína na semente apresentou resposta quadrática, apresentando mínimo de 7,5% e máximo de 10,5% de proteína na semente.

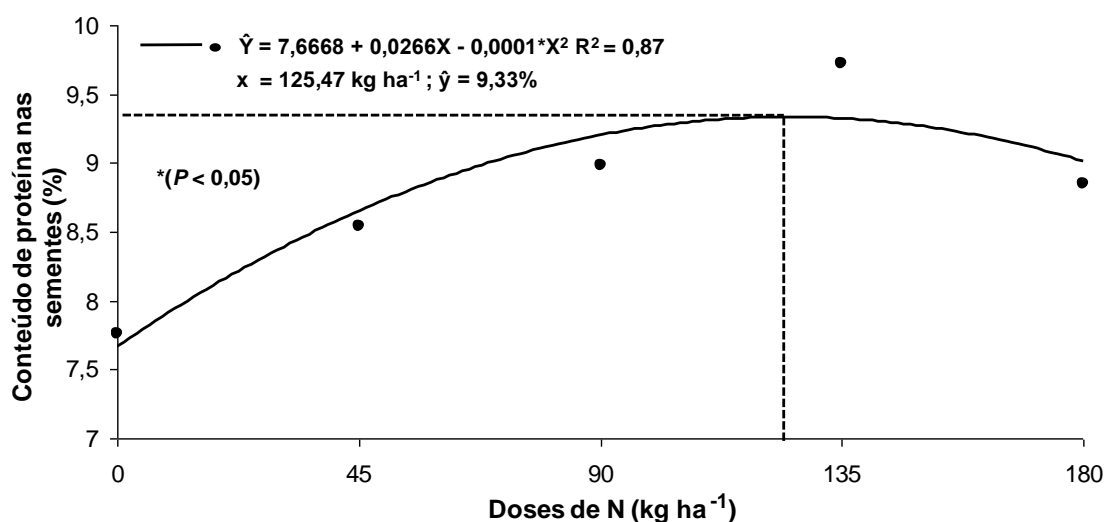


Figura 7. Regressão polinomial do conteúdo de proteína nas sementes de milho, em função das doses de nitrogênio, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Bueno et al. (2009) obtiveram aumento no conteúdo de proteína nos grãos, com o aumento na dose de N, com valores entre 8,76 e 11,42% de proteína.

Okumura et al. (2013) obtiveram variação de 5,71 a 7,91% nos conteúdos de proteína, apresentando ajuste linear na porcentagem de proteína com a elevação das doses de N aplicadas, que variaram entre 0 a 200 kg ha⁻¹ de N.

Silva et al. (2011) observaram que os conteúdos de proteína nos grãos variaram linearmente com a aplicação de N em cobertura, resultando em 9,78 a 11,98% para as doses de 60 a 240 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. O conteúdo de proteína e minerais nos grãos depende da cultivar, da disponibilidade de água e nutrientes no solo e das condições climáticas durante a fase de formação dos grãos (KALINOVA; MOUDRY, 2006).

Diferentes pesquisas têm mostrado variações inter e intraespecíficas no acúmulo e na utilização de N entre os cereais, e a tendência dessas plantas de somente aumentar o conteúdo de proteína nos grãos, quando suas produtividades aproximam-se da produtividade máxima (MEDICI et al., 2004, 2005, BUENO et al., 2009).

Na Figura 8, está apresentada a regressão polinomial do conteúdo de nitrogênio, em função das doses de N, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Observa-se que não houve aumento significativo para a inoculação com *Azospirillum brasilense* e aplicação do biorregulador no conteúdo de nitrogênio nas sementes.

Dartora et al. (2013) verificou que o conteúdo de N nos grãos foi influenciado pela inoculação, observando-se média superior para a inoculação combinada das estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropediceae*, em relação à inoculação isolada de *Azospirillum brasilense*.

Com relação às doses de nitrogênio, estas apresentaram efeito significativo. Os resultados ajustaram-se de maneira quadrática assemelhando com os resultados dos conteúdos de proteínas, com ponto de máximo em 125,47 kg ha⁻¹ de N. Esse ajuste está relacionado ao aumento do período fotossintético durante o estágio de enchimento de grãos, o que contribuiu para

melhorar a translocação de fotoassimilados e o enchimento de grãos (GOES et al., 2013).

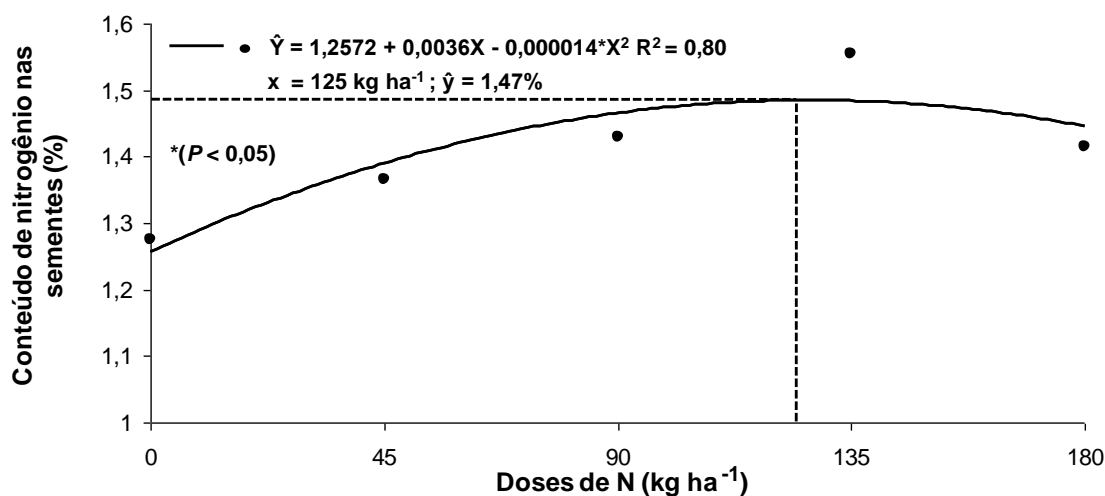


Figura 8. Regressão polinomial do conteúdo de nitrogênio nas sementes de milho, em função das doses de nitrogênio, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de biorregulador, em dois anos agrícolas.

Essa variação no conteúdo de nitrogênio, também pode estar relacionada com a marcha de absorção e translocação do nitrogênio durante o ciclo da cultura e o balanço de NH_4 e NO_3 , pois a cada tonelada de grãos produzida demanda, em média, 16,4 kg de N, dos quais 64% é exportado para a semente (SETIYONO et al., 2010).

A planta quando adequadamente suprida de N, retarda a senescência foliar e aumenta o período de elevada taxa fotossintética. Estas características são importantes para cultivos no segundo ano agrícola, pois podem aumentar o enchimento das sementes e, por conseguinte, a qualidade fisiológica das sementes (LEE; TOLLENAAR, 2007; PRANDO et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

O aumento da dose de nitrogênio pode contribuir para a melhoria da qualidade fisiológica da semente de milho e associada à prática da inoculação com *Azospirillum brasilense*, proporciona a produção de sementes mais vigorosas.

A aplicação de 113 kg ha⁻¹ de N afeta positivamente o vigor das sementes, expresso pela primeira contagem da germinação e pelo teste de frio modificado.

Os conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio nas sementes foram alterados positivamente, em função das doses de nitrogênio.

A aplicação de 250 mL ha⁻¹ do biorregulador não influenciou na germinação, bem como nos conteúdos de óleo, proteínas e nitrogênio das sementes de milho.

5. REFERÊNCIAS

- ABBSI, M. K.; SHARIF, S.; KAZMI, M.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**, v. 145, n. 1, p. 159-168, 2011.
- ABRANTES, F. L.; KULCZYNSKI, S. M.; SORATTO, R. P.; BARBOS, M. M. M. Nitrogênio em cobertura e qualidade fisiológica e sanitária de sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3 p.106-115, 2010.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; ÁVILA, M. R.; BARBOSA, M. C.; RICCI, T. T.; ALBRECHT, A. J. P. Aplicação de biorregulador na produtividade do algodoeiro e qualidade de fibra. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 191-198, 2009.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. J. P.; BARBOSA, M. C. Qualidade das sementes de soja produzidas sob manejo com biorregulador. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 39-48, 2010.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. J. P.; RICCI, T. T. Manejo de biorregulador nos componentes de produção e desempenho das plantas de soja. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 6, p. 865-876, 2011.
- A. O. A. C - Association of Official Analytical Chemist. **Official methods of the Association of Official Analytical Chemist**. 15. ed. Washington, D. C.: A.O.A.C, 1990. v. 1, p. 209-230.
- ARAÚJO, A. E. S.; ROSSETO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; ALBRECHT, L. P.; VIDIGAL FILHO, P. S. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 98-111, 2007.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ALBRECHT, L. P.; TONIN, T. A.; STÜLP, M. Bioregulator application, agronomic efficiency, and quality of soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 6, p. 567-691, 2008.
- ÁVILA, M. B.; ALBRECHT, L. P. Isoflavonas e a qualidade das sementes de soja. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 1, p. 15-29, 2010.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247 p.

BARROS, A. S. R.; DIAS, M. C. L. L.; CÍCERO, S. M.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de frio. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. cap. 5, p. 1-15.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, (Issue null), p. 77-136, 2010.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BONO, J. A. M.; RODRIGUES, A. P. D. C.; MAUAD, M.; ALBUQUERQUE, J. C.; YAMAMOTO, C. R.; CHERMOUTH, K. S.; FREITA, M. E. Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Agrarian**, v. 1, n. 2, p. 91-102, 2008.

BOX, G. E. P. Non-normality and tests on variances. **Biometrika**, v. 40, n. 3-4, p. 318-335, 1953.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BUENO, L. G.; CHAVES, L. J.; OLIVEIRA, J. P.; BRASIL, E. M.; REIS, A. J. S.; ASSUNÇÃO, A.; PEREIRA, A. F.; RAMOS, M. R. Controle genético do teor protéico nos grãos e de caracteres agrônômicos em milho cultivado com diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 590-598, 2009.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 53-63, 2008.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 74-79, 2009.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; MARQUES JUNIOR, R. B.; OLIVARES, F. L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 545-548, 2008.

CRUSCIOL, C. A. C.; LIMA, E. D.; ANDREOTTI, M.; NAKAGAWA, J.; LEMOS, L. B.; MARUBAYASHI, O. M. Efeito do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica, produtividade e características de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.108-115, 2003.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, PB, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995. 80 p.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JR., P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; GARCIA, R. A. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

DUARTE, A. P.; CARVALHO, C. R. L.; CAVICHIOLI, J. C. Densidade, teor de óleo e produtividade de grãos em híbridos de milho. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 759-767, 2008.

DUARTE, A. P.; MASON, S. C.; JACKSON, D. S.; KIEHL, J. C. Grain quality of Brazilian maize genotype as influenced by nitrogen level. **Crop Science**, v. 45, n. 5, p. 1958-1864, 2005.

EGESEL, C. O.; KAHRIMAN, F.; GÜL, K. M. Discrimination of maize inbreds for kernel quality traits and fatty acid composition by a multivariate technique. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 4, p. 613-620, 2011.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação dos solos**. Brasília, 1999.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, **Sistema de produção de milho**, 8ª. Ed., Versão eletrônica, EMBRAPA- CNPMS: Sete Lagoas, Out/2012, Acesso em

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p.

EVERETTI, B. **A handbook of statistical analysis using SAS**. 2. ed. Boca Raton: Chapman e Hall/CRC, 2001.

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Produtividade e qualidade fisiológica de sementes de feijão em função de sistemas de manejo de solo e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 102-109, 2006.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agrônomicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 63 p.

FISCHER, S. E, FISCHER, S. I.; MAGRIS, S.; MORI, G. B. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 895-903, 2007.

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

GEUS, Y. N.; GOGGI, A. S.; POLLAK, L. M. Seed quality of high protein corn lines in low input and conventional farming systems. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 28, n. 4, p. 541-550, 2008.

GOES, R. J.; RODRIGUES, R. A. F.; TAKASU, A. T.; ARF, O. Características agrônomicas e produtividade do milho sob fontes e doses de nitrogênio em cobertura no inverno. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.3, p. 250-259, 2013.

GONDIM, T. C. O.; ROCHA, V. S.; SANTOS, M. M.; MIRANDA, G. V. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho crioulo sob estresse causado por baixo nível de nitrogênio. **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 413-417, 2006.

HARRIS, H. C.; McWILLIAM, J. R.; MASON, W. K. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 3, p. 1203-1212, 1978.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; AELST, A. C. V.; HEMMINGA, M. A. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 9, p. 1121-1131, 1999.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA de SALAMONE, I. (Comp.). *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35

I.A.L - Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 1985. v. 1, p. 533.

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. **Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1987. 35 p.

IMOLES, A. S.; PINHO, E. V. R. V.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, M. G. G. C.; CORRÊA, R. S. B. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.17-25, 2001.

KALINOVA, J.; MOUDRY, J. Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 45-49, 2006.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

KLAHOLD, C. A.; GUIMARÃES, V. F.; ECHER, M. M.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R. L.; BECHER, L. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 179-185, 2006.

KOUTROUBAS, S. D.; PAPAKOSTA, D. K.; DOITSINIS, A. Water requirements for castor oil crop (*Ricinus communis* L.) in a Mediterranean climate. **Crop Science**, v. 40, n. 1, p. 33-41, 2000.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades – Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 7 p.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, v. 15, n. 4, p. 281-307, 2005.

LAMBERT, R. J. High-oil corn hybrids. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 123-145.

- LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v. 149, n. 3, p. 243-247, 2006.
- LEE, E. A.; TOLLENAAR, M. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. **Crop Science**, v. 47, p. 202- 215, 2007.
- LEE, H. S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C. W.; CHOI, S. J.; CHUNG, K. Y. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 5, p. 402-408, 2006.
- LOPES, H. M.; GALVÃO, J. C. C.; DAVID, A. M. S. S.; ALMEIDA, A. A.; ARAÚJO, E. F.; MOREIRA, L. B.; VIEIRA MIRANDA, G. V. Qualidade física e fisiológica de sementes de milho em função da adubação mineral e orgânica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 265-275, 2004.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plant**. 3. ed. New York: Academic Press, 2011. p. 672.
- MEDICI, L. O.; PEREIRA, M. B.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Agricultural Science**, v. 142, n. 5, p. 535-541, 2004.
- MEDICI, L. O.; PEREIRA, M. B.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Identification of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 903-915, 2005.
- MEIRELES, R. C.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F. REIS, L. S.; LYRA, G. B.; MARINHO, A. B. Influência do nitrogênio e das lâminas de irrigação na qualidade fisiológica das sementes de mamoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 216-221, 2009.
- MILLÉO, M. V. R.; VENÂNCIO, W. S.; MONFERDINI, M. A. Avaliação da eficiência agrônômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 67, (supl.), p. 1-145, 2000.
- MILLER, R. L.; DUDLEY, J. W.; ALEXANDER, D. E. High intensity selection for percent oil in corn. **Crop Science**, v. 21, n. 3, p. 433-437, 1981.
- MINUZZI, A.; BRACCINI, A. L.; RANGEL, M. A. S.; SCAPIM, C. A.; BARBOSA, M. C.; ALBRECHT, L. A. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 176-185, 2010.
- MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; BONATO, C. M.; CONRADO, T. Efeito de biorregulador na germinação e no vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, v. 58, n. 5, p. 651-660, 2011.

MUNAMAVA, M. R.; GOGGI, A. S.; POLLAK, L. M. Seed quality of maize inbred lines with different composition and genetic backgrounds. **Crop Science**, v. 44, n. 2, p. 542–548, 2002.

NIELSEN, D. C.; HALVORSON, A. D.; VIGIL, M. F. Critical precipitation period for dryland maize production. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 118, n. 3, p. 259–263, 2010.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; SOUZA, A. A. T.; FERREIRA, J. A.; SOUZA, M. S. Interação entre salinidade e bioestimulante na cultura do feijão caupi. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 465-471, 2013.

OKUMURA, R. S.; YANO, G. T.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C.; TAKAHASHI, H. W. Nutrição nitrogenada no milho fertilizado com uréia tratada com inibidor de uréase. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 157-170, 2013.

OKUMURA, R. S.; VIDIGAL FILHO, P. S, SCAPIM, C. A.; MARQUES, O. J.; FRANCO, A. A. N.; SOUZA, R. S.; RECHE, D. L. Effects of nitrogen rates and timing of nitrogen topdressing applications on the nutritional and agronomic traits of sweet corn. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 391-398, 2014.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143-1150, 2007.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2º ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

PRANDO, A. M.; ZUCARELI, C.; FRONZA, V.; OLIVEIRA, E. A. P.; PANOFF, B. Formas de ureia e doses de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, 2012.

RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; JANDHYALA V. K.; PAPENDICK, R. I.; PARR, J. F. Cultivar and climatic effects on the protein content of soft white winter wheat. **Agronomy Journal**, v. 85, n. 5, p.1023-1028, 1993.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

REYNOLDS, T. L.; NEMETH, M. A.; GLENN, K. C.; RIDLEY, W. P.; ASTWOOD, J. D. Natural variability of metabolites in maize grain: differences due to genetic background. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10061-10067, 2005.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARE, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305–339, 2009.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.

SANTOS, C. A. C.; PEIXOTO, C. P.; VIEIRA, E. L.; CARVALHO, E. V.; PEIXOTO, V. A. B. Stimulate[®] na germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de girassol. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 605-616, 2013.

SCHUCH, L. O. B.; NEDEL, J. L.; MAIA, M. S.; ASSIS, F. N. Vigor de sementes e adubação nitrogenada em aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 127-134, 1999.

SETIYONO, T. D.; WALTERS, D. T.; CASSMAN, K. G.; WITT, C.; DOBERMANN, A. Estimating maize nutrient uptake requirements. **Field Crops Research**, v. 118, p. 158- 168, 2010.

SHAHAROONA, B.; JAMROO, G. M.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; MEMON, K. S. Effectiveness of various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 1300–1307, 2007.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SILVA, D. R. G.; PEREIRA, A. F.; DOURADO, R. L.; SILVA, F. P.; ÁVILA, F. W.; FAQUIN, V. Productivity and efficiency of nitrogen fertilization in maize under different levels of urea and NBPT-treated urea. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 516-523, 2011.

SILVA, R. H.; ZUCARELI, C.; NAKAGAWA, J.; SILVA, R. A.; CAVARIANI, C. Doses e épocas de aplicação do nitrogênio na produção e qualidade de sementes de aveia-preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 51-55, 2001.

SILVA, T. T. A.; PINHO, E. V. R. V.; CARDOSO, D. L.; FERREIRA, C. A.; ALVIN, P. O. Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 840-846, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, n. 1, p. 55-60, 1994.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.

STOLLER DO BRASIL. **Stimulate Mo em hortaliças**. Cosmópolis, 1998. v. 1. Informativo técnico. 1 p.

TEKRONY, D. M. Precision is an essential component in seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 435-447, 2003.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CESAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

URIBELARREA M.; BELOW F. E.; MOOSE S. P. Grain composition and productivity of maize hybrids derived from the Illinois Protein strains in response to variable nitrogen supply. **Crop Science**, v. 44, n. 5, p. 1593–1600, 2004.

VASAL, S. K. High quality protein corn. In: HALLAUER, A. R. (ED). **Speciality corns**. Boca Raton: CRC Press. 1994. p. 79-122.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Coord.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. cap. 4, p. 1-26.

VITTI, G. C.; CAMARGO, M. A. F.; LARA, C. **Síntese de análise químicas em tecido vegetal**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 487-511, 2001.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 2009.

ZUCARELI, C.; PANOFF, B.; PORTUGAL, G.; FONSECA, I. C. B. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 480 - 487, 2012.

APÉNDICE

Tabela 1A. Características agronômicas do híbrido de milho 30F35 YH

Acúmulo térmico (GD) no desenvolvimento do milho	
VE a VT	822
VT a R6	1011
Doenças	Níveis de tolerância
<i>Puccinia sorghi</i>	MR
<i>Puccinia polysora</i>	MR
<i>Physopella zeae</i>	MS
<i>Exserohilum turcicum</i>	MR
<i>Phaeosphaeria maydis</i>	MR
Corn stunt– enfezamento	MR
Doenças do colmo	R
Doenças de grãos	MS
<i>Cercospora zeae maydis</i>	MR
Tolerância a herbicidas	
Accent® 25 g ha ⁻¹ + Atrazina 2,5 L ha ⁻¹	Aplicar com cuidado
Nicosulfuron 0,5 L ha ⁻¹ + Atrazina 2,5 L ha ⁻¹	Aplicar com cuidado
Nicosulfuron 1,25 L ha ⁻¹	Não aplicar
Mesotriona 0,3 L ha ⁻¹ + Atrazina 2,5 L ha ⁻¹	Sem restrição
Tembotriona 0,24 L ha ⁻¹ + Atrazina 2,5 L ha ⁻¹	Restrição
Análise bromatológica	
Massa Fresca (kg ha ⁻¹)	57,965
Massa Seca (kg ha ⁻¹)	17,680
Nutrientes digestíveis totais (%)	68,9
Fibra em detergente ácido (%)	25,7
Fibra em detergente neutro (%)	40,9
Proteína bruta (%)	6,6
População de plantas	
Espaçamento	Plantas*
Tradicional (80 - 90 cm)	55 – 65
Reduzido (45 - 50 cm)	60 – 65
Fator de reprodução de nematóides**	
<i>P. brachyurus</i>	3,7
<i>M. javanica</i>	1,5
<i>M. incógnita</i>	2,2

VE: Emergência da cultura; VT: Pendoamento; R6: Maturidade fisiológica; S: Suscetível; MS: Moderadamente suscetível; MR: Moderadamente resistente; R: Resistente; *: mil plantas ha⁻¹; **: FR<1: redutor; FR=1: não multiplica; FR>1: multiplicador.

Obs.: Os escores das doenças referem a dados médios observados a campo, podendo sofrer variações em função das condições de manejo, clima e pressão de doenças.

Tabela 2A. Resumo das análises de regressões para altura de planta (A.P), número de fileiras de grãos por espiga (N.F.G.E), número de grãos por fileira por espiga (N.G.F), massa de mil grãos (M.M.G), produtividade (PROD.) e teor foliar de N (T.F.N)

F.V ¹	Quadrados médios						
	G.L ²	A.P	N.F.G.E	N.G.F	M.M.G	T.F.N	PROD.
Doses/anos	8	0,0514*	0,0235 ^{n.s}	51,5085*	2320,2353*	42,7004*	3714441,0883*
Doses/1ºano	(4)	0,3926*	1,8160*	350,5607*	10431,9508*	159,7797*	84513005,8455*
R. linear	1	1,5584*	6,7670*	1343,3201*	41269,4958*	237,014*	334762953,5081*
R. quadrática	1	0,0116 ^{n.s}	0,2357 ^{n.s}	25,4100 ^{n.s}	3,4790 ^{n.s}	3,806 ^{n.s}	2167007,9430 ^{n.s}
Desvios	2	0,0000 ^{n.s}	0,0013 ^{n.s}	1,6846 ^{n.s}	452,6510 ^{n.s}	3,2178 ^{n.s}	423808,6303 ^{n.s}
Doses/2ºano	(4)	0,0941*	1,6168*	76,9111*	1197,0907*	298,6895*	42486947,9310*
R. linear	1	0,3760*	6,3700*	303,3001*	4722,8317*	1115,8162*	168427660,5691*
R. quadrática	1	0,0005 ^{n.s}	0,0786 ^{n.s}	1,9201 ^{n.s}	42,8785 ^{n.s}	3,9623 ^{n.s}	147780,6241 ^{n.s}
Desvios	2	0,0000 ^{n.s}	0,0183 ^{n.s}	1,5603 ^{n.s}	1,0226 ^{n.s}	4,4728 ^{n.s}	68426,5276 ^{n.s}
Doses/bio.	8	0,0007 ^{n.s}	0,1236 ^{n.s}	5,6268 ^{n.s}	434,8485 ^{n.s}	1,0939 ^{n.s}	2124257,9229*
Doses/Aus.Bio.	(4)	0,2250*	2,3735*	228,1277*	5913,2277*	210,3465*	60761473,6239*
R. linear	1	9,2433*	9,2433*	869,4426*	22563,1737*	812,8070*	231253632,3567*
R. quadrática	1	0,0848 ^{n.s}	0,0848 ^{n.s}	24,0001 ^{n.s}	222,6745 ^{n.s}	0,0688 ^{n.s}	4717667,5048*
Desvios	2	0,0108 ^{n.s}	0,0108 ^{n.s}	1,5180 ^{n.s}	230,5473 ^{n.s}	4,7551 ^{n.s}	2011385,8870 ^{n.s}
Doses/Pre.Bio.	(4)	0,2110*	1,1594 ^{n.s}	153,4625*	3830,4269*	206,5162*	64648296,9873*
E. linear	1	4,3470*	4,3470*	604,2026*	14801,4914*	815,2694*	258163623,5171*
E. quadrática	1	0,2252 ^{n.s}	0,2252 ^{n.s}	2,3333 ^{n.s}	104,8438 ^{n.s}	3,8571 ^{n.s}	99553,3133 ^{n.s}
Desvios	2	0,0021 ^{n.s}	0,0021 ^{n.s}	1,6406 ^{n.s}	50,4538 ^{n.s}	3,4691 ^{n.s}	255674,7027 ^{n.s}

(¹): Fontes de Variação; (²): G.L: Graus de Liberdade; (*): Significativo pelo teste “F” a 5% de probabilidade; (^{n.s}): não-significativo; Aus. Bio: Ausência do biorregulador; Pre. Bio: Presença do biorregulador; (R): Regressão.

Tabela 3A. Resumo das análises de regressões para plântulas normais da germinação (P.N), contagem final da germinação (C.F), frio modificado (F.M), condutividade elétrica (C.E), conteúdo de óleo, proteína (P) e N

F.V ¹	Quadrados médios			
	G.L	Regressão linear	Regressão Quadrática	Desvios da regressão
Plântulas normais (P.N)	1	123,0187*	160,0952*	6,47507 ^{ns}
Contagem final (C.F)	1	733,8380*	81,1343 ^{ns}	0,0964 ^{ns}
Frio modificado (F.M)	1	70,7558 ^{ns}	89,1407*	11,2763 ^{ns}
Condutividade elétrica (C.E)	1	114,2993*	0,3299 ^{ns}	4,0908 ^{ns}
Óleo	1	115,9940*	0,5417 ^{ns}	4,6191 ^{ns}
Proteína (P)	1	54,3111*	31,2181*	4,5100 ^{ns}
N	1	1,0650*	0,5468*	0,1961 ^{ns}

Equações	Coeficiente de determinação (R ²)						
	P.N	C.F	F.M	C.E	Óleo	P	N
R. linear	0,32	0,80	0,29	0,96	0,95	0,55	0,53
R. quadrática	0,74	0,88	0,64	0,96	0,96	0,87	0,80

(¹): Fontes de Variação; (²): G.L: Graus de Liberdade; (*): Significativo pelo teste "F" a 5% de probabilidade; (^{ns}): não-significativo. (R): Regressão.

Tabela 4A. Desdobramento de *Azospirillum/anos agrícolas** Doses*Biorregulador

F.V	Doses de N (kg ha ⁻¹)									
	0		45		90		135		180	
	Aus. Bio.	Pres. Bio	Aus. Bio.	Pres. Bio	Aus. Bio.	Pres. Bio	Aus. Bio.	Pres. Bio	Aus. Bio.	Pres. Bio
Plântulas normais (%)										
2010/2011										
Não inoculado	75,50 Aa	77,16 Aa	76,26 Aa	78,25 Aa	79,91 Aa	79,58 Aa	78,25 Aa	78,33 Aa	77,08 Aa	77,58 Aa
Inoculado	77,58 Aa	76,83 Aa	77,41 Aa	78,75 Aa	79,16 Aa	80,08 Aa	77,16 Aa	77,83 Aa	78,08 Aa	78,50 Aa
2011/2012										
Não inoculado	76,33 Aa	72,50 Aa	78,50 Aa	77,83 Aa	76,25 Aa	80,50 Aa	80,50 Aa	79,25 Aa	80,50 Aa	79,16 Aa
Inoculado	69,66 Bb	76,16 Aa	79,16 Aa	80,16 Aa	79,25 Aa	76,00 Aa	74,00 Ab	75,00 Aa	77,00 Aa	77,08 Aa
Contagem final (%)										
2010/2011										
Não inoculado	83,75 Aa	84,33 Aa	86,50 Aa	87,50 Aa	87,08 Aa	88,91 Aa	89,83 Aa	90,41 Aa	92,25 Aa	92,83 Aa
Inoculado	81,08 Aa	81,83 Aa	86,33 Aa	85,75 Aa	88,16 Aa	88,66 Aa	89,08 Aa	90,33 Aa	92,16 Aa	92,75 Aa
2011/2012										
Não inoculado	83,00 Aa	80,50 Aa	85,08 Aa	83,25 Aa	82,41 Aa	87,50 Aa	86,58 Aa	82,08 Aa	84,00 Aa	84,33 Aa
Inoculado	77,25 Aa	81,16 Aa	82,50 Aa	85,16 Aa	83,00 Aa	82,00 Aa	79,33 Ba	79,33 Aa	81,16 Aa	80,41 Aa
Frio modificado (%)										
2010/2011										
Não inoculado	79,66 Aa	77,16 Aa	80,91 Aa	81,16 Aa	81,66 Aa	83,41 Aa	83,00 Aa	82,33 Aa	83,58 Aa	80,50 Aa
Inoculado	80,58 Aa	77,00 Aa	81,16 Aa	84,58 Aa	81,58 Aa	81,58 Aa	82,41 Aa	78,25 Aa	80,25 Aa	84,41 Aa
2011/2012										
Não inoculado	87,33 Aa	87,33 Aa	89,66 Aa	88,55 Aa	85,11 Aa	87,99 Aa	87,22 Aa	86,33 Aa	88,10 Aa	88,33 Aa
Inoculado	84,55 Aa	83,10 Aa	87,44 Aa	87,11 Aa	87,55 Aa	86,55 Aa	82,21 Aa	87,99 Aa	85,10 Aa	85,21 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste F; Aus. Bio: Ausência do biorregulador; Pres. Bio: Presença do biorregulador.