

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM* SPP. EM SEMENTES DE GENÓTIPOS
DE MILHO CULTIVADOS NO RIO GRANDE DO SUL**

**Patrícia Dörr de Quadros
(Dissertação de Mestrado)**

**Porto Alegre
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM* SPP. EM SEMENTES DE GENÓTIPOS
DE MILHO CULTIVADOS NO RIO GRANDE DO SUL**

**Patrícia Dörr de Quadros
Engenheira Agrônoma (UFRGS)**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção
ao Grau de Mestre em Ciência do Solo.

**Porto Alegre (RS) Brasil
2009**

Página de homologação

Dedico à minha filha Camille Vitória.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Flávio Camargo e Luiz Fernando W. Roesch pela confiança e apoio no decorrer do meu mestrado;

Aos professores Paulo Regis F. da Silva e Enilson S. de Sá pelo apoio e sugestões;

À minha mãe e meu pai, apoio incondicional, carinho e confiança;

À Urubitan, pelo amor, dedicação, paciência e apoio.

À amiga Maria Izolete pelo apoio e incentivo desde o tempo da faculdade;

À Andressa, Cátia, Lucélia, Vanessa, Robson, Diôni, Viviane, Analú e Daniela pela amizade, divertido convívio e ajuda no laboratório.

À Vladirene, Paulo Endrigo, Leonardo, Michael e Douglas pela amizade, coleguismo e ajuda no campo;

Aos colegas, amigos e professores do Departamento de Solos, pela amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM* SPP. EM SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS NO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Patrícia Dörr de Quadros
Orientador: Flávio A. de Oliveira Camargo

RESUMO

Bactérias diazotróficas podem fixar nitrogênio e produzir auxinas, substâncias responsáveis pelo estímulo ao crescimento das plantas, podendo reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho. Para testar esta hipótese, este trabalho teve como objetivo avaliar a inoculação de espécies de *Azospirillum* em sementes de genótipos de milho cultivados no estado do Rio Grande do Sul. A atividade experimental foi realizada em três etapas, tendo a primeira etapa o objetivo de selecionar em vasos, cultivares de milho eficientes na associação com uma espécie de *Azospirillum*, que resultou na seleção de dois híbridos cujo desempenho foi avaliado com a inoculação de uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (segunda etapa – em vasos). A terceira etapa foi realizada em campo, em um Argissolo Vermelho Distrófico típico, onde três híbridos foram testados em tratamentos com e sem inoculação e adubação nitrogenada com o objetivo de avaliar a campo as características agrônômicas das plantas. O genótipo de milho influenciou na associação entre as bactérias e as plantas. A inoculação de bactérias diazotróficas aumentou o volume das raízes nas cultivares avaliadas. As raízes das plantas apresentaram maior população de diazotróficos do que os colmos. A inoculação a campo aumentou o rendimento da massa seca da parte aérea híbridos AS 1575 e SHS 5050.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (60 p.) – Fevereiro, 2009.

INOCULATION OF *AZOSPIRILLUM* SPP. IN SEEDS OF MAIZE CULTIVARS CROPPED ON SOUTH BRAZIL²

Author: Patrícia Dörr de Quadros
Adviser: Flávio A. de Oliveira Camargo

ABSTRACT

Diazotrophic bacteria are able to fix nitrogen and produce auxins which are substances which increase plant growth reducing the use of nitrogen fertilizers. To test this hypothesis, this work was carry out aiming to evaluate the inoculation of *Azospirillum* species in maize cultivars cropped in Rio Grande do Sul / Brazil. The experimental activity was conducted in three steps, being the first step the selection in pots of maize cultivars, effective in association with one *Azospirillum* specie, which resulted in the selection of two cultivars whose performance was evaluated with the inoculation of a mixture of three species of *Azospirillum* (second step – in pots). The third step was conducted in an Argissolo Vermelho Distrófico, where three hybrids were tested in treatments with and without inoculation and nitrogen fertilizer. This last step had the objective to evaluate in field conditions the agronomic performance of corn hybrid inoculated with diazotrophic bacteria. The genotype of plant development influenced the association between the bacteria and plants. The inoculation increased the total volume of roots. The bacterial population was higher in roots in relation to the stem. On the third step, it was observed with the inoculation an increase in dry matter yield of the AS 1575 and the SH 5050 cultivars.

² M. Sc.Dissertation in Agriculture (Soils). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (60 p.) – February, 2009.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas.....	04
2.2 Uso de <i>Azospirillum</i> como inoculante de cereais.....	06
2.3 Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos de <i>Azospirillum</i>	08
2.4 O processo de colonização da planta por <i>Azospirillum</i>	09
2.5 Potencial de inoculação de <i>Azospirillum</i> no milho.....	10
2.6 Seleção de genótipos para inoculação na cultura do milho.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Inoculação e seleção de cultivares de milho eficientes na associação com uma espécie de <i>Azospirillum</i>	13
3.1.1 Preparo dos vasos, inoculação e adubação.....	14
3.1.2 Coleta de plantas e quantificação do N total.....	14
3.1.3 Quantificação do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas.....	15
3.2 Inoculação de mistura de três espécies de <i>Azospirillum</i> e avaliação em dois estádios de desenvolvimento do milho.....	15
3.2.1 Preparo dos vasos, inoculação e adubação.....	16
3.2.2 Determinação do teor relativo de clorofila da folha.....	16
3.2.3 Coleta das plantas e quantificação do N total.....	17
3.2.4 Determinação do volume das raízes.....	17
3.2.5 Quantificação do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas.....	17
3.3 Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas.....	17
3.3.1 Preparo do inoculante.....	18
3.3.2 Semeadura e adubação.....	19
3.3.3 Teor relativo de clorofila nas folhas.....	19
3.3.4 Avaliações agrônomicas.....	20
3.3.5 Análises pós-colheita.....	20
3.3.6 NMP de células bacterianas associadas às raízes e colmos das plantas.....	20
3.4 Tratamento estatístico dos dados.....	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Inoculação e seleção de cultivares de milho eficientes na associação com uma espécie de <i>Azospirillum</i>	22
4.1.1 Avaliação da presença de diazotróficos nas plantas.....	22
4.1.2 Avaliação agronômica das cultivares.....	24
4.1.3 Seleção de duas cultivares para inoculação com três espécies de <i>Azospirillum</i>	26
4.2 Inoculação de mistura de três espécies de <i>Azospirillum</i> e avaliação em dois estádios de desenvolvimento do milho.....	26
4.2.1 Avaliação da presença de diazotróficos na planta.....	27
4.2.2 Avaliação agronômica das cultivares.....	29
4.2.3 Avaliação do teor relativo de clorofila na folha.....	31
4.3 Desempenho agronômico a campo de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas.....	33
4.3.1 Avaliação da presença de diazotróficos.....	33
4.3.2 Avaliação do teor relativo de clorofila na folha.....	35
4.3.3 Avaliação agronômica das cultivares.....	37
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
7. ANEXOS	52
7.1 Meios de cultura e soluções utilizadas.....	52
7.2 Registro fotográfico	55
8. VITA	60

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
01. Teor de N da parte aérea e raízes e massa seca da parte aérea no estágio V ₈ de 10 cultivares de milho com e sem inoculação e adubação nitrogenada no estágio V (conforme escala de Ritchie <i>et al</i> , 1993) na etapa de seleção de cultivares. Porto Alegre, 2007.	25
02. Teor de nitrogênio nas raízes e na parte aérea e volume de raízes de dois híbridos de milho em tratamentos com e sem inoculação e adubação nitrogenada, nos estádios V ₈ e V ₁₂ (conforme escala de RITCHIE <i>et al</i> , 1993). Porto Alegre, 2007.	30
03. Leitura do clorofilômetro (leitura <i>SPAD - Soil Plant Analysis Development</i>) realizada nas folhas das plantas, em seis estádios de desenvolvimento do milho. Eldorado do Sul / RS, 2008.	36
04. Avaliação da estatura de plantas em quatro estádios de desenvolvimento, número total de folhas no pendoamento e senescência foliar de três híbridos de milho, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.	38
05. Características agronômicas de três híbridos de milho, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.	40

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
01. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g de matéria fresca de raízes em 10 cultivares de milho, com e sem adubação nitrogenada e com e sem inoculação, de acordo com a tabela de McCrady para três diluições, na etapa de seleção de cultivares. Porto Alegre, 2007.	23
02. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g de matéria fresca de raízes em dois híbridos de milho, com e sem adubação nitrogenada e com e sem inoculação, de acordo com a tabela de McCrady para três diluições, na etapa de avaliação do inoculante. Porto Alegre, 2007.	27
03. Teor relativo de clorofila na folha (leitura <i>SPAD</i>) e erro padrão entre repetições na etapa de avaliação da inoculação de três espécies de <i>Azospirillum</i> em plantas de milho, avaliado dos 12 aos 47 dias após a emergência das plantas, nos híbridos D 2B587 e P 32R48. Porto Alegre, 2007.	32
04. Logaritmo do número mais provável (NMP) de células bacterianas por grama de matéria fresca de raiz (a) e colmo (b) de milho, sob tratamentos com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.	34

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas de importância econômica para o estado do Rio Grande do Sul e necessita grandes quantidades de nitrogênio (N) para complementar a quantidade suprida pelo solo, e/ou adicionada ao solo na semeadura e em cobertura, quando se deseja produtividade elevada. Além do alto custo deste insumo, os riscos de poluição ambiental decorrentes da adubação nitrogenada podem ser elevados, especialmente em condições de intensa precipitação e altas doses de adubação. A safra brasileira de milho de 2007/08 teve uma produção de 58 milhões de toneladas (CONAB, 2008). Em média se utilizam 22 kg de N para cada 1.000 quilos de grãos produzidos, sendo assim, estima-se que foram utilizados 2.890 mil toneladas de uréia (45% N) para esta produção nesta safra.

Tendo em vista os custos ambientais e econômicos e o fato de que o Brasil importa atualmente 70% da uréia utilizada na agricultura (Bonifácio & Sousa, 2007), se faz necessário encontrar alternativas viáveis que visem a redução no seu uso. Deste modo, a inoculação de bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca pela sustentabilidade, visto que estes microrganismos podem atuar na disponibilidade de N para a planta, além de produzirem auxinas, substâncias responsáveis pelo estímulo ao crescimento das plantas, podendo desta maneira reduzir a utilização de uréia na cultura do milho (Reis, 2006).

Entre as bactérias diazotróficas, destacam-se as do gênero *Azospirillum*, que podem colonizar as raízes e o colmo da planta, sem causar sintomas de doença (Terver & Hollis, 2002). Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal incluem ações diretas como a fixação biológica de nitrogênio (Baldani *et al.*, 1997), produção de reguladores de crescimento vegetal (Cassán *et al.*, 2001), solubilização de fosfato inorgânico (Verma *et al.*

2001), e ações indiretas como o controle biológico (Kloepper *et al.* 1999; Benchimol *et al.* 2000), produção de sideróforos (Lodewyckx *et al.* 2002) e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Jetiyanon & Kloepper, 2002).

A colonização de plantas de milho por bactérias diazotróficas pode ser afetada por muitos fatores bióticos e abióticos, e a simples presença destas bactérias na planta não é indicativo de promoção de crescimento, visto que bactérias diazotróficas nativas geralmente não são eficientes na fixação de N. Por este motivo, as pesquisas devem selecionar bactérias eficientes, com potencial de fixação de N e de produção de substâncias promotoras do crescimento de plantas e competitivas com outras estirpes nativas ou com outros componentes da microbiota do solo, assim como, selecionar genótipos de milho aptos a associarem-se às bactérias.

Diversos estudos com bactérias diazotróficas têm sido realizados no Brasil, porém a grande maioria é realizada “*in vitro*”, em vasos ou tanques. Questões fisiológicas, genéticas e bioquímicas a respeito de muitos diazotróficos já foram abordadas, porém experimentos a campo se fazem estritamente necessários quando se deseja obter dados sobre a interação planta-bactéria-ambiente, visto que um dos objetivos do estudo sobre diazotróficos é fazer desta tecnologia uma alternativa para os agricultores e, para tal, precisa ser viável agronomicamente.

Com base nos pontos abordados anteriormente, supõe-se que a inoculação de linhagens selecionadas de *Azospirillum* em milho possa reduzir a necessidade de adubação nitrogenada nesta cultura, bem como é possível que o genótipo da planta desempenhe papel essencial na colonização das bactérias. Esta colonização poderá mais efetiva quando inoculado uma mistura de espécies de diazotróficos, visto que os fatores edafoclimáticos do local de cultivo podem beneficiar algumas espécies ou linhagens e prejudicar outras, aumentando assim a probabilidade de sucesso da inoculação.

Tendo em vista a melhor exploração do potencial das bactérias diazotróficas na agricultura, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a inoculação de espécies de *Azospirillum* em sementes de genótipos de milho cultivados no estado do RS. Especificamente, o trabalho visa numa primeira etapa a seleção de cultivares com alto e baixo potenciais de associação com

as bactérias, para serem testadas na segunda etapa, com e sem adubação nitrogenada, em dois estádios de desenvolvimento das plantas. A terceira etapa visa testar três híbridos a campo com e sem inoculação de três espécies de *Azospirillum*, com e sem adubação nitrogenada, em um Argissolo Vermelho Distrófico típico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será abordada a importância da fixação biológica do N em gramíneas, assim como aspectos fisiológicos das bactérias utilizadas neste trabalho e fatores importantes a serem considerados quanto à inoculação de bactérias diazotróficas no milho.

2.1 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

O nitrogênio (N) é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, etc, o que o torna, portanto, essencial à sobrevivência e ao crescimento dos organismos. Embora constitua quase 80% da atmosfera terrestre, o N gasoso, N_2 , é quimicamente inerte a temperaturas atmosféricas e, diferentemente de outros elementos que ocorrem na natureza, suas reservas minerais são relativamente raras. A reação de redução de N atmosférico a amônia – fixação de N – requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, por exemplo, o processo de fixação de nitrogênio desenvolvido por Harber–Bosch para síntese de amônia emprega temperaturas entre 300 e 500°C e pressões acima de 300 atm, sendo utilizados catalisadores à base de ferro (Kim & Rees, 1994). A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes, sendo que mais de 100 milhões de toneladas são anualmente utilizadas na agricultura, uma demanda que implica em altos custos financeiros, energéticos e ambientais (Newton, 2000).

Na natureza, somente um pequeno número de microrganismos, denominados diazotróficos, ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia. Esse processo que é chamado fixação

biológica do nitrogênio (FBN), é realizado pelo complexo protéico da nitrogenase, a enzima que catalisa a reação (Eady & Postgate, 1974). Evolutivamente, acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de N se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de N (nitratos e nitritos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seu crescimento, ocasionando uma pressão seletiva que favoreceu o aparecimento da diazotrofia. A capacidade de fixar N seria, portanto, um evento relativamente precoce na evolução dos procariontes e anterior ao surgimento da fotossíntese (e conseqüente aumento da concentração de oxigênio livre na atmosfera), uma vez que a nitrogenase é extremamente sensível à desnaturação por oxigênio (Newton, 2000).

Estima-se que aproximadamente 5% das bactérias procarióticas têm os genes responsáveis pelo processo biológico de fixação de nitrogênio (Raymond *et al.*, 2004) sendo estes distribuídos nos cromossomos ou em plasmídeos. A FBN contribui com a maior parte do N fixado anualmente na Terra: aproximadamente 175 milhões de toneladas, representando cerca de 65% do total, o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (Moreira & Siqueira, 2006).

Os melhores resultados da fixação biológica de nitrogênio como potencial biotecnológico têm sido demonstrados para a interação rizóbium-leguminosas. A possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas, tais como o arroz (Boddey *et al.*, 1995a), cana-de-açúcar (James, 2000), milho, sorgo e trigo (Roncato-Maccari *et al.*, 2003) também tem sido descrita. Entre estas culturas, a cana-de-açúcar foi um dos melhores exemplos de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, devido à eficiência de uma espécie bacteriana usualmente utilizada nesta cultura, *Acetobacter diazotrophicus*, em fixar N para a planta – aproximadamente 48% da necessidade de N da cultura (Lima *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2002). Entretanto, o milho apresenta grande potencial a ser explorado em termos da viabilidade da inoculação, pois pode ser colonizado simultaneamente por grande diversidade de bactérias diazotróficas (Roesch, 2007).

Bactérias diazotróficas que se associam a gramíneas e a cereais, possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças, sendo consideradas promotoras de crescimento vegetal. Além de fixarem N atmosférico, produzem hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, que estimulam o crescimento vegetal, principalmente de raízes, atuando na maior absorção de nutrientes e água (Peoples *et al.*, 1995; Fallik *et al.*, 1988; Dobbelaere *et al.*, 1999; Lambrecht *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1983). Podem agir como solubilizadores de fosfatos ou acelerar processos biológicos como a mineralização (Persello-Cartineaux *et al.*, 2003). Também podem agir no crescimento de forma indireta, protegendo a planta de fungos patógenos do solo ou de bactérias patogênicas através de vários mecanismos como produção de sideróforos, chitinases, glucanases e antibiose (Whipps, 2001).

No processo da FBN, um dos complicadores é a transferência do N fixado para a planta, que ocorre muito lentamente e apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal (Dommelen *et al.*, 1998). A morte e subsequente mineralização de diazotróficos podem liberar significativas quantidades de N fixado (Lethbridge & Davidson, 1983; Lee *et al.*, 1994), porém este processo é ineficiente e demorado quando comparado à fixação de N por microorganismos simbióticos em leguminosas (Mylona *et al.*, 1995).

Considerando a importância e a urgência do desenvolvimento de produtos que venham a substituir ou diminuir a utilização de energias não renováveis, a pesquisa sobre bactérias diazotróficas se faz necessária e pode trazer benefícios aos sistemas produtivos e à sustentabilidade da agricultura.

2.2 Uso de *Azospirillum* como inoculante de cereais

Dentre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com cereais e gramíneas, as espécies de *Azospirillum* constituem um dos grupos mais bem estudados atualmente, sendo numerosos os trabalhos sobre sua ecologia, fisiologia e genética (Baldani *et al.*, 1997; Bashan & Holguin, 1997).

Reis Junior *et al* (2008) verificaram o comportamento de dois híbridos intervarietais de milho sob diferentes doses e formas de N e o efeito da inoculação com *Azospirillum amazonense*, em um ensaio em casa de

vegetação, e constataram que a inoculação com *A. amazonense* aumentou a produção de matéria seca e o acúmulo de N nas raízes.

Em condições de campo, foram observados os benefícios e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em genótipos de trigo sob diferentes doses de N. Observou-se ainda que a inoculação da estirpe IAC-AT-8-*Azospirillum brasilense* aumentou o N acumulado na espiga (Rodrigues Sala *et al.*, 2006).

Um sumário de experimentos envolvendo a inoculação de *Azospirillum* em gramíneas conduzidos na década de 90 em diversos países tais como: Israel, França, Bélgica, Argentina, Uruguai, México e África do Sul foi publicado por Dobbelaere *et al.* (2001). Na Bélgica a inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp245 e *A. irakense* KBC1 aumentaram a biomassa seca de plantas de trigo em 62 e 46 % respectivamente. Outras revisões também apresentam resultados positivos do uso destes produtos para a agricultura (Kennedy *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004).

Baldani *et al.* (1983) sugeriram que a superioridade da estirpe Sp 245 de *A. brasilense* nos estudos de inoculação em trigo deve estar relacionada com a seleção inicial e uso de estirpes homólogas. Alguns estudos de inoculação em arroz mostraram resultados promissores para a inoculação de plantas com *Herbaspirillum seropedicae* (aumentos de 17-19% do N derivado de FBN) e *Burkholderia* sp. (11 a 20%) em experimento de vasos (Baldani, 1996). Estes resultados indicam que a diversidade da população bacteriana diazotrófica pode auxiliar na efetivação da inoculação. Sumner (1990) descreveu um levantamento de dados sobre a aplicação de estirpes de *Azospirillum* em cereais e observou que 32 ensaios apresentaram respostas positivas à inoculação rendimento de grãos (dados entre os anos de 1983 a 1985).

De uma maneira geral, 60 a 70% dos experimentos citados por Okon & Labandera-Gonzalez (1994), mostraram incrementos de rendimento com a inoculação, no entanto, somente 5-30% apresentaram respostas estatisticamente significativas. Esta variabilidade pode estar relacionada interação planta-bactéria, bem como ao limitado conhecimento sobre o potencial de uso destes organismos.

Fazendo-se um balanço dos resultados de experimentos de inoculação com *Azospirillum*, verificou-se grande variabilidade nos resultados em culturas como trigo, arroz, milho e sorgo, onde a média de incremento na produtividade está em torno de 20 a 30%. Embora inoculantes comerciais baseados em *Azospirillum* já estejam comercialmente disponíveis em alguns países, a sua aplicação ainda é restrita devido a limitações e a inconsistências no desempenho do processo de colonização da planta pelas bactérias (Morrissey *et al.* 2004).

2.3 Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos de *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas de vida livre amplamente encontradas em solos de clima tropical e subtropical, em associação com as raízes de gramíneas de grande importância econômica, como milho, arroz, trigo e diversas forrageiras, além de outras espécies vegetais. De 30 a 90% das amostras de solo coletadas em todo o mundo contém *A. brasilense* ou *A. lipoferum* (Döbereiner & Day, 1976).

São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete e usualmente uniflageladas, apresentando um movimento vibróide característico. *A. brasilense*, *A. irakense*, *A. largimobile* e *A. lipoferum* possuem um padrão flagelar misto, em que um flagelo polar é sintetizado durante o crescimento em meio líquido e vários flagelos laterais são adicionalmente sintetizados durante o crescimento em meio sólido (Hall & Krieg, 1984). *A. amazonense*, *A. dobereineriae* e *A. halopraeferens* possuem apenas o flagelo polar.

A alta motilidade exibida pelas células, aliada à quimiotaxia positiva para certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (Barak *et al.*, 1983; Reinhold *et al.*, 1985; Zhulin *et al.*, 1988), provavelmente, confere a *Azospirillum* uma vantagem seletiva importante sobre outros microrganismos na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas vezes limitada.

Os metabolismos de carbono e nitrogênio apresentados pelas espécies de *Azospirillum* são bastante dinâmicos e variados. As fontes de carbono preferenciais são ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, havendo também uma aparente preferência de frutose sobre glicose. Amônia,

nitrato, nitrito e aminoácidos, além de nitrogênio atmosférico, podem servir como fontes de nitrogênio (Döbereiner, 1992).

Para *A. brasilense*, podem-se salientar duas características distintivas, que são sua alta mobilidade, evidente mesmo em culturas alcalinas envelhecidas (Döbereiner, 1992) e a incapacidade de utilizar glicose como fonte de carbono, devido à ausência de um transportador específico na membrana plasmática e de enzimas glicolíticas (Goebel & Krieg, 1984).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas “*in vitro*” (Hartman & Zimmer, 1994). Tem-se verificado que a liberação destes fitohormônios estimula a formação de pêlos radiculares, a taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por estas bactérias.

2.4 O processo de colonização da planta por *Azospirillum*

As plantas são consideradas um complexo micro ecossistema composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias endofíticas (Chelius & Triplett, 2001; Lodewyckx *et al.*, 2002). A efetivação da colonização vai depender de aspectos como escolha da estirpe, estado fisiológico da planta e da bactéria, genótipo da planta, aspectos físico-químicos do solo, competição com outros microorganismos, veículo de inoculação entre outros.

Dois tipos de associações radiculares têm sido descritas: uma, em nível de superfície e outra, internamente. No primeiro caso, a bactéria coloniza indistintamente toda a superfície radicular, formando pequenos agregados, algumas vezes embebidos em mucigel, e raramente coloniza a superfície dos pêlos radiculares (Patriquin & Döbereiner, 1978; Umali-Garcia *et al.*, 1980). No caso de uma associação endofítica, ocorre a colonização pelo *Azospirillum* dos espaços intercelulares das células da epiderme e do córtex radicular na zona de alongamento e formação dos pêlos radiculares, os quais muitas vezes não apresentam sinais de ruptura. Raramente, porém, invadem o tecido vascular e o interior das células. Segundo Döbereiner (1992), quando uma população se estabelece na rizosfera, uma população interna também se desenvolve especialmente no aerênquima radicular e vasos do protoxilema, onde as

concentrações de oxigênio são mais baixas e, assim, favorecem a atividade da fixação do nitrogênio.

O processo de ligação da bactéria à radícula ou raiz se realiza em duas etapas: a primeira (fase de adsorção) dura aproximadamente duas horas, é reversível, e provavelmente envolve apenas proteínas; a segunda (fase de ancoramento) dura de 8 a 16h, é irreversível e provavelmente envolve polissacarídeos de superfície (Michiels *et al*, 1991). Ambas as fases são mediadas pela ação do flagelo polar de *Azospirillum*, cuja participação na fase de adsorção é decisiva. Diferentes mutantes de *A. brasilense* desprovidos do flagelo são incapazes de se ligar às raízes de trigo; a desestruturação do flagelo por tratamento térmico ou químico elimina a capacidade de adsorção da bactéria; flagelos polares purificados são capazes de se ligar às raízes das plantas, ao passo que flagelos laterais não (Michiels *et al*, 1991). Na fase do ancoramento, observa-se semelhança ao processo que ocorre nas espécies de rizóbios (Mylona *et al*, 1995), a formação de diversos agregados bacterianos, tendo sido sugerido que o processo de colonização só se torna viável quando um número mínimo de microorganismos está presente nas raízes (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

2.5 Potencial de inoculação de *Azospirillum* em milho

Considerando o cultivo do milho, sabe-se que o rendimento é o resultado do potencial genético da semente, das condições edafoclimáticas, do local de semeadura e do manejo adotado na lavoura. O milho possui uma via fotossintética (C4) mais eficiente do que as leguminosas e, com isto, é capaz de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores, além disso, apresenta um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo. Este tipo de planta pode mais facilmente dispensar fontes energéticas para a alimentação de bactérias diazotróficas e para o processo energeticamente caro da conversão do N₂ atmosférico em formas combinadas utilizáveis pelas plantas (Döbereiner, 1992).

Em plantas de milho, a maioria dos experimentos foi conduzida com a inoculação de *Azospirillum*, mostrando aumentos de rendimento de aproximadamente 25% (Kennedy *et al.*, 2004). Esta contribuição das bactérias

é maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado (Dobbelaere *et al.*, 2003). Inoculantes comerciais contendo mistura de diazotróficos já foram desenvolvidos para inoculação em milho e têm sido testados em condições de campo. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) com *A. lipoferum* (estirpe Br17), chamado Zea-Nit™, da Companhia Heligenetics. Na França, foi lançado um produto a base de *Azospirillum* spp. denominado Azo Green™. Seu uso em um experimento a campo com milho na estação de Agbasar, na África, aumentou em 100% o rendimento de grãos (Fages & Mulard, 1988). De acordo com Muñoz-Garcia *et al.* (1991), a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* cepa UAP 77, aumentou a matéria seca de raízes de 54 a 86% e a matéria seca da parte aérea de 23 a 64%. Por sua vez, Salomone e Döbereiner (1996) avaliando 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, constataram aumento no rendimento de grãos, variando em diferentes genótipos, da ordem de 1.700 a 7.300 kg ha⁻¹; contudo, tais resultados são bastante influenciados pelas condições de solo, ambiente e genótipos de planta.

Okon & Vanderleyden (1997), baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação a campo, concluem que o gênero *Azospirillum* promove ganhos em rendimento em importantes culturas nas mais variadas condições de clima e solo; contudo, salientam que o ganho com *Azospirillum* vai mais além do que simplesmente auxiliar na fixação biológica do nitrogênio, interferindo também no aumento da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, no aumento do volume de substrato do solo explorado. Tal constatação é justificada pelo fato da inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas, também, o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias. Pelo menos parte, ou talvez muitos desses efeitos de *Azospirillum* spp. nas plantas, possam ser atribuídos à produção de substâncias promotoras de crescimento pela bactéria, entre elas as auxinas, giberelinas e citoquininas, e não somente à fixação biológica de nitrogênio

O sucesso da inoculação de bactérias diazotróficas em milho depende da pesquisa interdisciplinar envolvendo o solo, a planta e as bactérias, visto estar muito clara a influência destas bactérias nas plantas. Resultados obtidos em laboratório devem ser testados a campo, sendo necessária a seleção de genótipos de milho eficientes em associarem-se à bactérias diazotróficas assim como de linhagens que estabelecem relações mais íntimas e estáveis com a planta hospedeira e que potencializem a utilização simultânea de fertilizantes.

2.6 Seleção de genótipos para inoculação na cultura do milho

A exsudação radicular pode determinar quais organismos vão residir na rizosfera (Nehl *et al.*, 1996). A maioria dos fotossintetizados acaba no solo pelos exsudatos radiculares, mucilagens, escamação e morte de células dos pêlos absorventes (rizodeposição). Esta matéria orgânica representa energia que é usada por organismos do solo.

Plantas e bactérias variam em sua interação, levando a alterações metabólicas importantes que podem influenciar a maneira como plantas e microrganismos interagem. Barak *et al.* (1983), Reinhold *et al.* (1985) e Zhulin *et al.* (1988) demonstraram a motilidade exibida por *Azospirillum* em direção a certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos. Embora o termo especificidade hospedeira não seja usado para caracterizar estas associações, tem-se demonstrado que existe certa afinidade entre estirpes e cultivares (Wani *et al.*, 1985) ou entre a bactéria e espécies de plantas (Penot *et al.*, 1992). Dentro deste ponto de vista, pode-se sugerir que a população de *Azospirillum* varia de cultivar para cultivar, em função das diferenças na composição química dos exudatos radiculares, sendo atraídos ou não em direção a estas fontes de carbono (quimiotaxia), visto que cada cultivar tem um genótipo distinto, com quantidade e qualidade de exudatos radiculares diferenciáveis.

Para sucesso da inoculação, é importante a escolha de genótipos adaptados às condições locais e propensos à colonização de bactérias diazotróficas, assim como, selecionar bactérias eficientes em fixar nitrogênio e em produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade experimental foi realizada em três etapas, tendo a primeira etapa o objetivo de selecionar cultivares de milho (em vasos), eficientes na associação com uma espécie de *Azospirillum*, que resultou na seleção de duas cultivares cujo desempenho foi avaliado com a inoculação de uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (segunda etapa, em vasos). A terceira etapa foi realizada em campo, em um Argissolo Vermelho Distrófico típico no RS, onde três híbridos foram testados em quatro tratamentos com e sem inoculação e adubação nitrogenada com o objetivo de avaliar a campo as características agrônômicas dos híbridos inoculados.

3.1 Inoculação e seleção de cultivares de milho eficientes na associação com uma espécie de *Azospirillum*

Este experimento foi realizado em vasos, na casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Anexo 7.2, Foto 2) em Porto Alegre, onde dez cultivares dentre as mais utilizadas no estado do RS foram avaliadas, sendo duas variedades: Fepagro RS-22 e Embrapa Missões; e oito híbridos: Agroeste 1560, Agroeste 1575, Dow Agrosiences 2A120, Dow Agrosiences 2B587 Pioneer 30F53, Pioneer 32R48, Santa Helena SHS 5050, e Syngenta NB3234. Para a inoculação, foi utilizada uma espécie de *Azospirillum* (linhagem EL-S - *Azospirillum brasilense*, isolado de plantas de milho em Eldorado do Sul/RS).

Os tratamentos foram: a) controle (sem N e sem inoculação); b) com inoculação (sem N) e c) com N (dose equivalente a 130 kg ha⁻¹ de N, sem inoculação). Foram utilizadas três repetições por tratamento, totalizando 90 vasos (com capacidade de cinco litros cada um), com uma planta por vaso.

3.1.1 Preparo dos vasos, inoculação e adubação

Os vasos foram desinfestados com álcool 70% por 1 minuto, seguido da aplicação de hipoclorito de sódio 2,5% por 4 minutos e então lavados com água estéril. Após, foram preenchidos com vermiculita previamente esterilizada em autoclave por 1h30min, a 120°C e 111 kgf cm⁻² de pressão. As sementes de milho foram desinfestadas com álcool 70% por 50 segundos, hipoclorito de sódio 2% por cinco minutos e lavadas com água estéril por cinco vezes. As sementes foram germinadas em placas de petry contendo papel filtro umedecido com água estéril. Para preparo do inóculo do tratamento com bactérias, colônias purificadas foram multiplicadas em meio de cultura Dygs (anexo 7.1) (Döbereiner, 1995) por 24 horas sob agitação e temperatura de 28°C. O caldo bacteriano foi centrifugado por dez min a 10.000 RPM e o pellet ressuspenso em solução salina. Este inóculo foi padronizado para aproximadamente 10⁷ células mL⁻¹. Para isto, foi feita uma curva de calibração correlacionando o n° de UFC (plaqueamento de diluições sucessivas do caldo bacteriano e incubação por 24h a 28°C), com a leitura da absorbância (densidade óptica) do caldo bacteriano em espectrofotômetro a 453nm. Uma alíquota de um ml do inóculo foi adicionada sobre cada semente do tratamento com bactérias (Anexo 7.2, Foto 1). Após quatro dias de germinação em estufa a 28°C, as plântulas foram transferidas para os vasos, acondicionados em casa de vegetação - estufa de vidro.

A umidade do substrato foi mantida com aplicação em dias intercalados, de solução Sarruge estéril (Sarruge, 1975) na concentração de 25%, a qual contém micronutrientes, fósforo e potássio. Para os tratamentos com N, além da solução Sarruge foi utilizada solução de nitrato de amônio (NH₄NO₃), sendo que no tratamento com N foi adicionada dose equivalente a 130 kg ha⁻¹ de N (subdividida em 30 kg ha⁻¹ N na base e 100 kg ha⁻¹ de N em cobertura - estágio V₆ segundo escala de Ritchie *et al*, 1993).

3.1.2 Coleta das plantas e quantificação do N total

As plantas foram colhidas no estágio V₈, quando o número de fileiras de grãos é definido (Ritchie *et al*, 1993). As raízes e a parte aérea das plantas foram secas em estufa a 68°C durante sete dias e, após, este material foi

pesado para determinação da massa seca. Para quantificação de N, as amostras passaram por processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação, segundo metodologia de Tedesco *et al.* (1995).

3.1.3 Quantificação do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas

Para quantificação das bactérias diazotróficas, amostras de raízes e colmos das plantas de milho foram desinfestadas com álcool 70% por 50 segundos + hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, lavadas por 8 vezes em água estéril e após maceradas (10g de matéria fresca para 90 mL de solução salina – NaCl 1%) e diluídas serialmente até à diluição de 10^{-7} . Uma alíquota de 100 μ L das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foi inoculada em triplicata, em tubos contendo 8 mL de meio de cultura NFb (livre de nitrogênio), sendo incubados a 30 °C por sete dias. Após o período de incubação, procedeu-se a contagem dos tubos negativos e positivos, sendo que foram considerados tubos com crescimento positivo aqueles que apresentaram a película característica de crescimento de bactérias diazotróficas (na condição microaerófila). Os dados da contagem foram utilizados para quantificação do número mais provável (NMP) de bactérias por grama de matéria fresca, segundo Döbereiner *et al.* (1995).

3.2 Inoculação de mistura de três espécies de *Azospirillum* e avaliação em dois estádios de desenvolvimento da planta

Este experimento foi realizado em vasos, na casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre. As cultivares utilizadas nesta etapa foram Pioneer 32R48 e Dow Agrosiences 2B587, respectivamente a mais e a menos apta à associação com as bactérias inoculadas no primeiro experimento.

Foi utilizado como inoculante uma mistura de três espécies de *Azospirillum*, sendo que da espécie *A. lipoferum* foram utilizadas duas linhagens diferentes: LG1-R (*Azospirillum lipoferum*), isolado de plantas de milho cultivadas no município de São Luíz Gonzaga/RS; L-S (*Azospirillum lipoferum*), isolado de plantas de milho cultivadas no município de

Livramento/RS; EL-S (*Azospirillum brasilense*), isolado de plantas de milho cultivadas no município de Eldorado do Sul/RS; M-S (*Azospirillum oryzae*), isolado de plantas de milho cultivadas no município de Marau/RS. As bactérias foram selecionadas por Roesch *et al.* (2007) por sua eficiência na fixação de N₂ e produção de auxinas *in vitro*.

Os tratamentos foram respectivamente: a) controle (sem N, sem inoculação); b) sem N, com inoculação; c) com N (equivalente a 30 kg ha⁻¹ de N) + com inoculação; d) com N (equivalente a 130 kg ha⁻¹ de N) sem inoculação. As avaliações foram feitas em dois estádios de desenvolvimento das plantas, com seis repetições para cada estádio (sendo três plantas para quantificação de N e massa seca e três plantas para determinação do volume das raízes e contagem bacteriana), totalizando 96 vasos (duas cultivares x quatro tratamentos x dois estádios x seis repetições), com uma planta por vaso (com capacidade para cinco litros).

3.2.1 Preparo dos vasos, inoculação e adubação

O procedimento de preparo dos vasos, inoculação e adubação foi realizado da mesma maneira que no primeiro experimento (item 3.1.1).

Para os tratamentos com N, além da solução Sarruge foi utilizada solução de nitrato de amônio (NH₄NO₃), sendo que no tratamento com N foi adicionada dose equivalente a 130 kg ha⁻¹ de N (subdividida em 30 kg ha⁻¹ de N na base e 100 kg ha⁻¹ de N em cobertura - estádio V₆), e no tratamento inoculado + N foi adicionado N somente em cobertura, em dose equivalente a 30 kg ha⁻¹ de N.

3.2.2 Determinação do teor relativo de clorofila da folha

A partir da primeira semana após a emergência, de cinco em cinco dias, foi determinado o teor relativo de clorofila na folha (leitura *SPAD*), com clorofilômetro marca Minolta, modelo 502. Os valores *SPAD* são estimados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha, em duas regiões de comprimento de onda (650 nm e 940 nm), sendo que a absorção de luz pela clorofila ocorre no primeiro comprimento de onda (Swiader &

Moore, 2002). As leituras foram realizadas na última folha completamente expandida de cada planta (duas leituras por planta).

3.2.3 Coleta de plantas e quantificação do N total

Metade (48 plantas) foi colhida no estágio V_8 e metade (48 plantas) no estágio V_{12} (quando o número de óvulos - grãos em potencial - em cada espiga, assim como o tamanho da espiga é definido) segundo escala de Ritchie *et al* (1993). As raízes e a parte aérea das plantas foram secas em estufa a 68°C durante sete dias, sendo após pesados para determinação da massa seca. Para quantificação de N, as amostras passaram pelos processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação, segundo metodologia de Tedesco *et al.* (1995).

3.2.4 Determinação do volume de raízes

A determinação do volume de raízes das plantas foi realizada logo após a sua colheita, respectivamente nos estádios V_8 e V_{12} . As raízes foram lavadas, secas com papel absorvente e submersas em proveta contendo 100 mL de solução de água destilada com álcool 70%, na proporção 4:1. O volume foi determinado pela diferença entre os volumes inicial e final do recipiente.

3.2.5 Quantificação do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas

A quantificação das bactérias diazotróficas presentes nas raízes e nos colmos das plantas de milho foi realizada conforme metodologia de Döbereiner *et al* (1995).

3.3 Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas

Este terceiro experimento foi conduzido de outubro de 2007 a março de 2008, no município de Eldorado do Sul, região ecoclimática da Depressão Central do RS. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa, e o solo da área

experimental é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (SBCS, 2006). As amostras de solo apresentaram os seguintes resultados (2007/08): argila: 27%; índice SMP: 6,1; P (Mehlich-I): 53 mg L⁻¹; K: 178 mg L⁻¹; matéria orgânica: 2,4%.

O delineamento experimental foi o completamente casualizado, disposto em fatorial 3 x 4, com quatro repetições. Foram testados três híbridos - Pioneer P 32R48 (P 32R48), Santa Helena 5050 (SHS 5050) e Agroeste 1575 (AS 1575) que foram selecionados por critérios de eficiência na associação com as bactérias, como alto NMP células g massa fresca de raiz⁻¹ e teor de massa seca da parte aérea superior no tratamento inoculado em relação ao controle no primeiro experimento. Os tratamentos aplicados aos três híbridos foram: a) sem inoculação e sem adição de adubação nitrogenada (controle); b) com inoculação, sem adição de adubação nitrogenada; c) com inoculação + adição de 50 kg ha⁻¹ de N (na base) e d) sem inoculação, com adição de 130 kg ha⁻¹ de N (50 kg ha⁻¹ de N na base + 80 kg ha⁻¹ de N em cobertura).

O experimento foi instalado numa área manejada sob plantio direto há 17 anos, em área com cultivo anual anterior de milho, sobre resteva de aveia-branca (Anexo 7.2, Foto 3).

3.3.1 Preparo do inoculante

Neste experimento, assim como no experimento anterior, foi inoculada uma mistura contendo três espécies de *Azospirillum*, sendo elas: EL-S (*A. brasilense*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de Eldorado do Sul/RS), LG1-R (*A. lipoferum*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de São Luiz Gonzaga / RS), M-S (*A. oryzae*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de Marau/RS) e a L-S (*A. lipoferum*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de Livramento/RS).

Para preparo do inóculo, colônias purificadas foram multiplicadas em meio de cultura dygs (Döbereiner, 1995) (anexo 7.1) por 24 horas sob agitação e temperatura de 28°C. O caldo bacteriano foi centrifugado por dez min a 10.000 RPM em tubos falcon de 50 mL. Após a eliminação do sobrenadante, foi adicionado novamente caldo bacteriano e repetiu-se o processo por mais duas vezes, a fim de se obter um grande número de células. Por último, as células foram ressuspensas em meio nutritivo dygs estéril. Este processo se

repetiu para cada uma das espécies e linhagens, sendo que o número de células foi padronizado para densidade óptica de 1,5 em leitura realizada em espectrofotômetro a 453nm. Após a padronização, foram misturadas as três espécies de *Azospirillum*, formando o inóculo para a turfa.

A turfa foi previamente seca ao ar e esterilizada em autoclave por 1h30min, a 120°C e 111 kgf cm⁻² de pressão, sendo que foi repetido este procedimento após 24h. À turfa seca e estéril, acrescentou-se o inóculo na proporção de 20 mL para cada 100g de turfa, que foi cuidadosamente homogeneizado com a ajuda de uma espátula. Após 24 horas de estabilização em ambiente refrigerado (4°C) realizou-se o procedimento de contagem do número de células do inoculante (turfa + inóculo), resultando no valor de 10⁷ células por grama de turfa.

Nos tratamentos com inoculação, as sementes de milho foram misturadas com solução de açúcar 30% mais o inoculante, na seguinte proporção: 10 kg sementes / 50 mL de solução açucarada / 100 g inoculante. Foi realizada a homogeneização e imediatamente realizou-se a semeadura.

3.3.2 Semeadura e adubação

A semeadura foi realizada com semeadora manual (saraquá), em parcelas de 3,2 x 5m (16 m²). O espaçamento entre linhas foi de 0,80m e o espaçamento entre plantas de 0,21m. Quando as plantas estavam com três a quatro folhas expandidas, foi realizado desbaste, mantendo-se 26 plantas por linha, totalizando uma densidade de 75.000 plantas por hectare (Anexo 7.2, Foto 4). A adubação fosfatada (100 kg ha⁻¹ de P₂O₅), potássica (100 kg ha⁻¹ de K₂O) e nitrogenada (290 kg ha⁻¹ de uréia no tratamento 130 kg ha⁻¹ de N, e 110 kg ha⁻¹ de uréia no tratamento inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N) foi realizada de acordo com a recomendação do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CFSRS/SC, 2004). Quando necessário, as plantas foram irrigadas por aspersão e receberam tratamento fitossanitário.

3.3.3 Teor relativo de clorofila nas folhas

A partir da primeira semana após a emergência, avaliou-se quinzenalmente o teor relativo de clorofila na folha, a leitura *SPAD* (*Soil Plant Analysis Development*), com clorofilômetro marca Minolta, modelo 502. As leituras foram realizadas sempre nas mesmas plantas, demarcadas no início do experimento na região do terço superior da última folha completamente expandida (duas leituras por planta, em três plantas por parcela) durante o período vegetativo (Anexo 7.2, Foto 6); no período reprodutivo, as leituras foram realizadas na folha índice (folha onde está inserida a espiga).

3.3.4 Avaliações agronômicas

Quinzenalmente, foi realizada a medição da estatura de planta (Anexo 7.2, Fotos 5, 7 e 8). Foi determinado o estágio de desenvolvimento das plantas conforme escala de Ritchie *et al* (1993), a senescência foliar e o florescimento das plantas (pendoamento e espigamento). Foi considerado pendoamento quando 50% das plantas da linha apresentaram o pendão liberando pólen e espigamento quando 75% das plantas da linha apresentaram espiga.

3.3.5 Análises pós-colheita

Na área útil da parcela (metragem linear sem falhas de plantas, excetuando-se a 1ª e 5ª linhas e a bordadura - 80 cm - do início e final da parcela) as espigas das plantas foram colhidas para análise dos componentes do rendimento (Anexo 7.2, Foto 9). Amostras da parte aérea das plantas, no centro de cada parcela, foram colhidas para análises do teor de N total, segundo metodologia descrita em Tedesco *et al*, (1995). Foram secas em estufa a 68°C durante sete dias e após, pesadas para avaliação da matéria seca.

3.3.6 NMP de células bacterianas associadas às raízes e colmos das plantas

A quantificação das bactérias diazotróficas presentes nas raízes e nos colmos das plantas no final do ciclo da cultura, foi realizada conforme metodologia de Döbereiner *et al* (1995).

3.4 Tratamento estatístico dos dados

Na primeira e segunda etapa do experimento, os resultados das determinações foram avaliados por meio do software estatístico SISVAR versão 5.0 (Ferreira, 2003), efetuando-se a análise de variância e o teste de Scott-Knott, ao nível de significância 5%. Na terceira etapa do experimento, os resultados foram avaliados por meio do software estatístico SAS, efetuando-se a análise de variância e o teste de Tukey, em nível de significância de 5% (SAS I. I., 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação e seleção de cultivares de milho eficientes na associação com uma espécie de *Azospirillum*

O objetivo desta etapa foi avaliar a inoculação de 10 genótipos de milho em relação á inoculação de uma espécie de *Azospirillum*.

4.1.1 Avaliação da presença de diazotróficos nas plantas

Para o NMP de bactérias presentes nas raízes frescas das plantas, consideraram-se superiores os tratamentos inoculados onde houve crescimento na ordem de dois logaritmos (Log) em relação ao tratamento controle, visto que aumentos de ordem menor que este podem estar relacionados a variações no comportamento fisiológico das células, e não devido ao evento da inoculação. As amostras oriundas das cultivares Pioneer 32R48, Pioneer 30F53, Fepagro RS-22 e AS 1575 se destacaram das demais, apresentando NMP entre $\text{Log}_{10}=5$ e $\text{Log}_{10}=6$ bactérias por grama de matéria fresca de raízes (Figura 1), valor aproximadamente 2 Log superior em relação aos tratamentos controle e com N. Entretanto, apenas a cultivar P 32R48 foi considerada estatisticamente superior quanto à associabilidade com as bactérias diazotróficas inoculadas, visto que apresentou NMP na ordem de dois Log maiores no tratamento inoculado em relação ao tratamento controle.

Vários estudos indicam que o genótipo interfere na resposta à inoculação de diazotróficos em gramíneas, como foi demonstrado para trigo (Avivi & Feldman, 1982), milho (Garcia de Salomone *et al.*, 1996) e milheto (Bouton *et al.*, 1985). Urquiaga *et al.* (1992), usando o método de diluição isotópica de ^{15}N mostraram claramente a diferença entre variedades de cana-

de-açúcar quanto ao ganho de N, sendo a variedade mais promissora capaz de obter além de 60% do N via FBN.

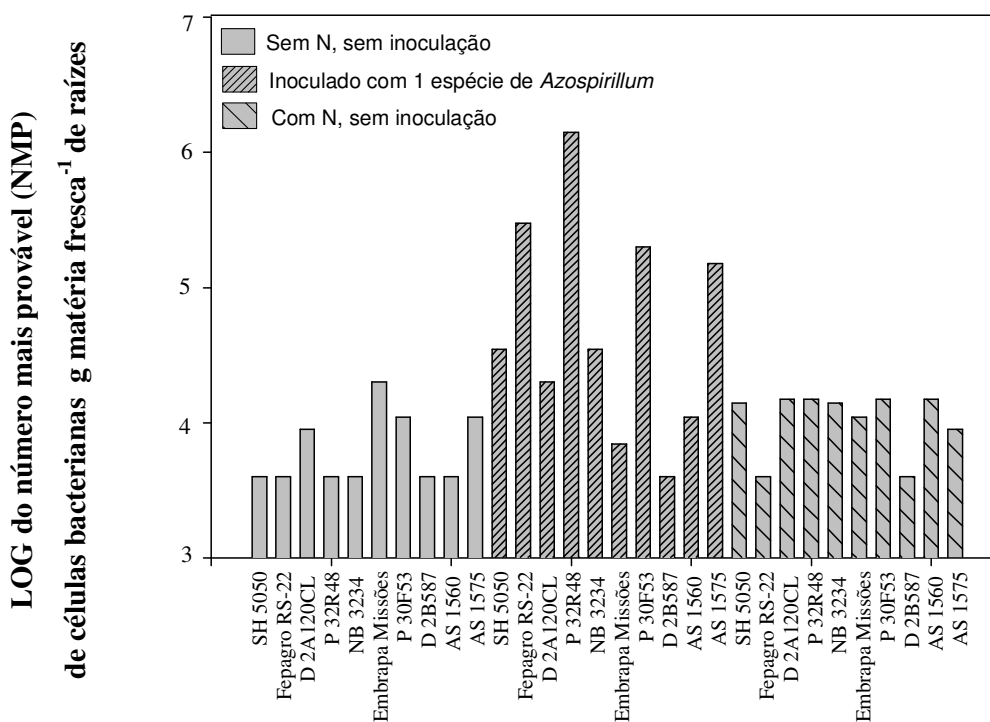


Figura 1. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g de matéria fresca de raízes em 10 cultivares de milho, com e sem adubação nitrogenada e com e sem inoculação, de acordo com a tabela de McCrady para três diluições, na etapa de seleção de cultivares. Porto Alegre, 2007.

Nas amostras oriundas do colmo das plantas, não foram detectadas bactérias diazotróficas através da técnica utilizada. Considerando que as sementes de milho utilizadas no experimento foram desinfestadas superficialmente, pré-germinadas em ambiente estéril e plantadas em vermiculita esterilizada, esta detecção de diazotróficos mesmo em amostras que não foram inoculadas (controle e com N) evidencia que as sementes de milho continham diazotróficos endofíticos, provavelmente oriundos da população nativa do solo de onde as plantas foram cultivadas. De acordo com Hallmann *et al.* (1997), estas bactérias podem se originar de sementes, propágulos vegetativos, rizosfera e filoplano. Roesch *et al.* (2006) não detectaram bactérias diazotróficas na área experimental antes da semeadura

do milho, no entanto, após a semeadura foram detectadas bactérias diazotróficas tanto no solo como no tecido vegetal.

Quando em condições de campo, devido à baixa quantidade de fontes de carbono disponível para as bactérias diazotróficas no solo (na ausência da planta hospedeira), assim como a variação do ambiente natural quanto às características de umidade, potencial redox, pH, potencial hídrico e salinidade, bem como a concorrência com a biota do solo, a pequena população de diazotróficos talvez não seja detectável com a técnica de contagem do NMP de células bacterianas em meio semi-sólido Reis *et al.* (2000) conforme Döbereiner a metodologia de *et al.* (1995).

4.1.2 Avaliação agrônômica dos cultivares

O teor de N (Tabela 1) das raízes das plantas na média das 10 cultivares foi de 1,07 mg g⁻¹ no tratamento controle; 0,98 mg g⁻¹ no tratamento inoculado e 1,70 mg g⁻¹ no tratamento com N. As cultivares P 32R48 e NB 3234 apresentaram 0,99 e 1,19 mg N g⁻¹ no tratamento inoculado, sendo estatisticamente superiores aos tratamentos controle, que apresentaram valores de respectivamente 0,67 e 0,85 mg N g⁻¹ massa seca das raízes.

Já na parte aérea das plantas, o teor médio de N foi de 1,38 mg g⁻¹ no tratamento controle; 1,52 mg g⁻¹ no tratamento inoculado e 4,06 mg de N g⁻¹ de massa seca no tratamento com N, entretanto nenhuma cultivar que recebeu inoculação diferiu-se do tratamento controle quando ao teor de N da parte aérea.

Quanto ao teor de massa seca da parte aérea (Tabela 1), as médias dos tratamentos controle, com inoculação e com N (sem inoculação) foram respectivamente de 3,7; 4,6 e 15,1 g por planta. O tratamento que recebeu dose equivalente a 130 kg de N foi estatisticamente superior aos demais tratamentos para todas as cultivares quanto a esta característica. Os valores de massa seca das cultivares P 32R48, NB 3234, SHS 5050, e Fepagro RS-22 no tratamento com inoculação foram superiores respectivamente em 52, 41, 27 e 17% aos valores destas mesmas cultivares no tratamento controle.

Tabela 1. Teor de N da parte aérea e raízes e massa seca da parte aérea no estágio V₈ de 10 cultivares de milho com e sem inoculação e adubação nitrogenada no estágio V (conforme escala de Ritchie *et al*, 1993) na etapa de seleção de cultivares. Porto Alegre, 2007.

TEOR DE NITROGÊNIO						
Cultivar	Raízesmg g ⁻¹			Parte aéreamg g ⁻¹		
	Controle	Inoculado, sem N	Com N, sem inoculação	Controle	Inoculado, sem N	Com N, sem inoculação
SH 5050	C 0,95 ns ¹	B 0,96	D 1,13	A 1,50 b	ns 1,77 b	A 5,89 a
RS-22	C 0,95 b	B 0,92 b	C 1,77 a	B 1,05 b	1,18 b	B 3,66 a
D 2A120CL	C 0,89 b	C 0,79 b	D 1,79 a	B 1,21 b	1,59 b	B 3,68 a
P 32R48	D 0,67 c	B 0,99 b	D 1,48 a	B 1,06 b	1,62 b	B 3,12 a
NB 3234	C 0,85 c	A 1,19 b	D 1,50 a	A 1,46 b	1,52 b	B 3,78 a
MISSÕES	C 1,04 b	B 1,04 b	B 2,06 a	A 1,58 b	1,45 b	A 4,71 a
P 30F53	B 1,14 b	B 0,93 b	A 2,31 a	A 1,53 b	1,48 b	A 3,48 a
D 2B587	B 1,20 b	B 0,96 c	C 1,62 a	B 1,37 b	1,41 b	A 4,10 a
AS 1560	A 1,57 b	B 1,01 b	A 2,99 a	A 1,52 b	1,48 b	A 3,62 a
AS 1575	C 0,89 b	B 1,01 b	A 2,32 a	A 1,52 b	1,70 b	A 4,57 a
Média	1,07	0,98	1,70	1,38	1,52	4,06
CV% = 6,82						
MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA						
Cultivar g planta ⁻¹					
	Controle	Inoculado, sem N		Com N, sem inoculação		
SH 5050	ns 3,59 c	ns 4,91 b		B 16,02 a		
RS-22	4,26 c	5,95 b		B 16,30 a		
D 2A120CL	3,94 b	4,70 b		B 15,49 a		
P 32R48	2,59 c	5,36 b		A 19,11 a		
NB 3234	2,90 c	4,87 b		B 15,68 a		
MISSÕES	3,92 b	3,23 b		C 11,86 a		
P 30F53	2,85 c	4,56 b		D 13,14 a		
D 2B587	3,53 b	4,54 b		D 13,61 a		
AS 1560	4,15 b	4,63 b		A 18,15 a		
AS 1575	2,65 b	4,24 b		C 12,25 a		
Média	3,73	4,70		15,16		
CV (%) = 13,64						

ns¹ = não significativo

*Médias antecedidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre tratamentos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os híbridos SHS 5050, NB 3234 e P 32R48 e a variedade Fepagro RS-22 foram consideradas promissoras para testes futuros de inoculação em sementes de milho por manterem uma população nas raízes cerca de 2 Log superior ao tratamento controle e por aumentarem consideravelmente a massa seca da parte aérea das plantas.

4.1.3 Seleção de duas cultivares para inoculação com três espécies de *Azospirillum*

Foram escolhidas as cultivares P 32R48 e D 2B587, como sendo respectivamente a mais apta e a menos apta na associação com as bactérias inoculadas, para serem testadas no experimento de inoculação de três espécies de *Azospirillum*, a fim de detectarem-se alterações na interação da planta com os microorganismos inoculados.

O híbrido P 32R48 foi selecionado por apresentar o maior NMP de células por grama de massa fresca de raiz entre as 10 cultivares no tratamento inoculado, sendo este valor na ordem de dois Log maior do que nos tratamentos controle e com N sem inoculação. Este híbrido apresentou 32% mais N das raízes no tratamento inoculado em relação ao controle comparando aos demais híbridos e matéria seca da parte aérea 52% maior em relação ao controle. E o híbrido D 2B587 foi selecionado por apresentar o mais baixo NMP de células por grama de massa fresca de raiz no tratamento inoculado, evidenciando baixa aptidão à associação com as bactérias inoculadas. Quanto ao teor de N das raízes, o tratamento com inoculação foi 20% inferior ao tratamento controle.

4.2 Inoculação de mistura de três espécies de *Azospirillum* e avaliação em dois estádios de desenvolvimento de dois híbridos de milho

Neste experimento, com a avaliação da inoculação de uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (sendo duas linhagens de *A. lipoferum*) nos híbridos P 32R48 e D 2B587 selecionados no experimento anterior, foi possível comparar estes dois genótipos quanto à inoculação de uma espécie ou de mistura contendo três espécies de *Azospirillum*. Desta forma pôde-se testar a hipótese de que a inoculação de uma mistura contendo três espécies pode ser mais eficiente do que a inoculação de apenas uma espécie de *Azospirillum*.

4.2.1 Avaliação da presença de diazotróficos na planta

O NMP de células bacterianas (Figura 2) encontradas nos tratamentos com inoculação no estágio V₁₂, foi de aproximadamente Log₁₀=6 células g matéria fresca⁻¹ na cultivar P 32R48 e de Log₁₀=5 células g matéria fresca⁻¹ no híbrido D 2B587.

Foi considerado crescimento populacional significativo, aquele onde houve acréscimo de dois Log no NMP de células por grama de massa fresca. Tendo em vista este critério, o aumento do NMP no híbrido P 32R48 nos tratamentos inoculado e inoculado + N (Log₁₀=6) foi significativo em relação ao tratamento controle (Log₁₀=3).

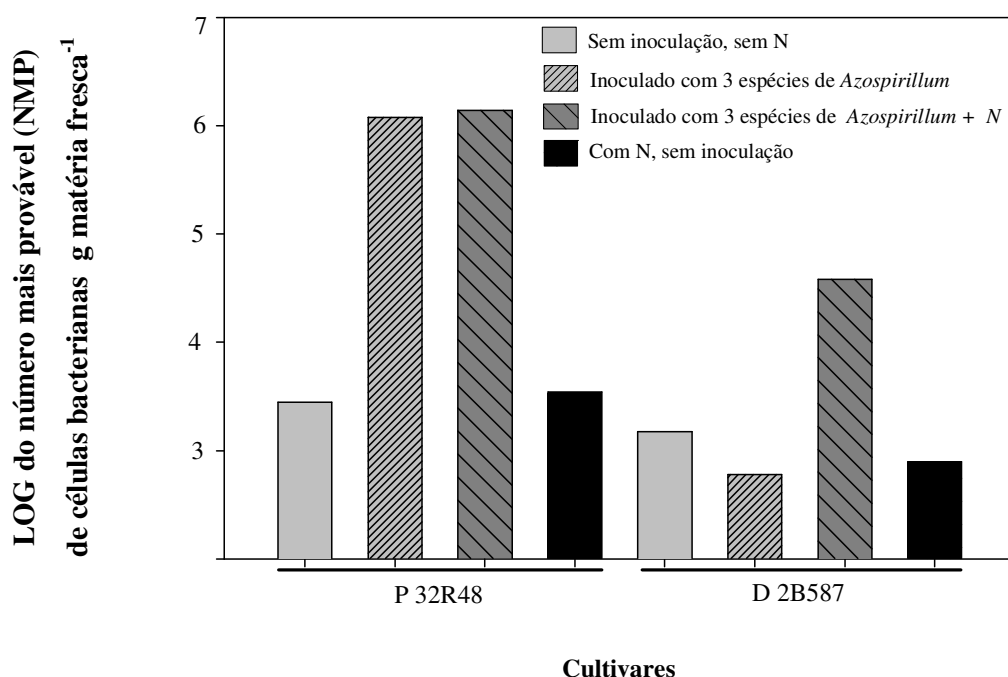


Figura 2. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g de matéria fresca de raízes em dois híbridos de milho, com e sem adubação nitrogenada e com e sem inoculação, de acordo com a tabela de McCrady para três diluições, na etapa de avaliação do inoculante. Porto Alegre, 2007.

Para o híbrido D 2B587, no tratamento com inoculação, sem N, a população bacteriana não se diferenciou do tratamento controle, apresentando inclusive NMP inferior ao mesmo. O mesmo comportamento foi observado no primeiro experimento, quando inoculada apenas uma espécie de *Azospirillum*

neste mesmo híbrido: não obteve-se diferença no NMP do tratamento inoculado em relação ao não inoculado (sem N). Porém no tratamento inoculado + N, o aumento de 2 Log no NMP foi significativo em relação ao tratamento controle (sem inoculação e sem N). Estes resultados mostram indícios de que sem aplicação de N na semeadura, o híbrido D 2B587 não é apto a associar-se a *Azospirillum*.

Nas amostras oriundas do colmo das plantas inoculadas com três espécies de *Azospirillum*, assim como nas inoculadas com uma espécie (experimento de seleção de cultivares), não foi detectada a presença de nenhum organismo diazotrófico com a aplicação da metodologia utilizada. Reis Junior *et al* (2000) encontraram resultados semelhantes em cana-de-açúcar. Observaram que o sítio preferencial de colonização das bactérias diazotróficas são as raízes, provavelmente por serem um dreno de fotoassimilados produzidos na parte aérea, compostos que são utilizados para sua sobrevivência.

Os resultados encontrados no primeiro e no segundo experimento sugerem que o genótipo das cultivares de milho influenciou na colonização da planta pelas bactérias, provavelmente devido à composição química dos exudatos radiculares liberados pelo sistema radicular do milho, que podem ou não servir como fontes de carbono para as bactérias inoculadas. Os exudatos variam entre genótipos (Kipe-Nolt *et al.* 1985) e, segundo Grayston *et al.* (1998), a variedade destes compostos liberados influencia também a diversidade dos organismos presentes na rizosfera. A movimentação dos microrganismos em direção às raízes das plantas ocorre quando existe um reconhecimento químico, denominado quimiotaxia, e acredita-se que os microrganismos sejam atraídos pelo gradiente de fontes de carbono (exudatos radiculares) existentes entre o solo e a rizosfera (Oliveira *et al.* 2003). A função quimioatrativa exercida pelos exudatos das raízes possui certo grau de especificidade (Benizri *et al.* 2001).

4.2.2 Avaliação agrônômica das cultivares

Quanto ao teor de N (Tabela 2) no estágio V₈, os híbridos P 32R48 e D 2B587 no tratamento inoculado apresentaram respectivamente 1,4 e 1,7 vezes mais nitrogênio na parte aérea em relação à inoculação com uma

espécie de *Azospirillum* (experimento de seleção de cultivares). O tratamento com N foi superior estatisticamente aos demais tratamentos independentemente do híbrido, da parte da planta e do estágio avaliado, exceto no estágio V₁₂ para o híbrido D 2B587, onde o teor de N das raízes foi igual estatisticamente aos dois tratamentos que receberam inoculação.

Observou-se que os tratamentos com inoculação foram superiores ao tratamento controle para os dois híbridos, nos dois estágios avaliados, tanto nas raízes como na parte aérea. O híbrido D 2B587 quando anteriormente inoculado com uma espécie de *Azospirillum* apresentou menores teores de N do que quando inoculado com três espécies de *Azospirillum*, tanto nas raízes quanto na parte aérea, não diferindo estatisticamente do híbrido P 32R38 nesta etapa de avaliação.

O volume de raízes (Tabela 2), nos tratamentos com inoculação foram, aproximadamente, 60 e 80% maiores em relação aos tratamentos não inoculados, para os híbridos P 32R48 e D 2B587 respectivamente, tanto no estágio V₈ quanto no V₁₂. No estágio V₈, o volume médio de raízes das plantas de milho foi de 10,6 cm³ para o tratamento controle, 16,5 cm³ para o tratamento inoculado, 17,0 cm³ para o tratamento inoculado + N, e 20,4 cm³ para o tratamento com N. O volume de raízes no estágio V₁₂ nos tratamentos com inoculação, foi superior aos tratamentos controle e com N (sem inoculação). Este efeito provavelmente se deve à produção de auxinas pelas bactérias, que estimula o crescimento de raízes secundárias, aumentando assim a área específica de absorção de água e nutrientes pela planta (El-Desouk Radwan *et al.* 2004).

Tabela 2. Teor de nitrogênio nas raízes e na parte aérea e volume de raízes de dois híbridos de milho em tratamentos com e sem inoculação e adubação nitrogenada, nos estádios V₈ e V₁₂ (conforme escala de RITCHIE *et al*, 1993). Porto Alegre, 2007.

Híbridos	Controle	Inoculado	Inoculado +N	Com N
TEOR DE NITROGÊNIO (N)				
..... mg g ⁻¹				
Raízes / Estádio V ₈				
P 32R48	ns ¹ 0,47 c	ns 1,03 b	ns 1,07 b	ns 1,39 a
D 2B587	0,46 c	1,38 b	1,39 b	1,55 a
Média	0,46	1,21	1,23	1,47
CV% = 4,31				
Parte aérea / Estádio V ₈				
P 32R48	ns 0,57 c	ns 2,19 b	ns 2,19 b	B 2,76 a
D 2B587	0,60 c	2,45 b	2,26 b	A 3,46 a
CV% = 6,36				
Raízes / Estádio V ₁₂				
P 32R48	ns 0,42 c	ns 1,32 b	ns 1,48 b	ns 1,64 a
D 2B587	0,46 b	1,75 a	1,54 a	1,81 a
Média	0,44	1,54	1,36	1,73
CV% = 4,12				
Parte aérea / Estádio V ₁₂				
P 32R48	ns 0,57 c	ns 2,23 b	ns 2,49 b	ns 3,30 a
D 2B587	0,65 c	2,23 b	2,66 b	3,42 a
Média	0,61	2,23	2,58	3,36
CV% = 6,25				
VOLUME DAS RAÍZES				
..... cm ³				
Estádio V ₈				
P 32R48	ns 9,6 c	ns 15,0 b	ns 15,0 b	A 17,6 a
D 2B587	11,6 c	18,0 b	19,0 b	B 23,6 a
CV% = 3,97				
Estádio V ₁₂				
P 32R48	ns 20,0 c	ns 38,0 a	A 37,6 a	A 32,3 b
D 2B587	21,0 c	35,6 a	B 33,3 a	B 28,0 b
CV% = 2,50				

ns¹ = não significativo

* Médias antecedidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre cultivares e médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre tratamentos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

4.2.3 Avaliação do teor relativo de clorofila na folha

Quanto aos valores obtidos com a leitura *SPAD* (Figura 3), observou-se que a inoculação aumentou o teor relativo de clorofila da folha em relação ao tratamento controle. No tratamento com inoculação + N em cobertura, em

que aos 32 dias foi aplicada adubação nitrogenada equivalente a 30 kg de N ha⁻¹, observou-se um aumento crescente nos valores de teor relativo de clorofila, sendo que aos 47 da emergência das plantas estes valores se aproximavam dos valores do tratamento sem inoculação + 130 kg ha⁻¹ de N.

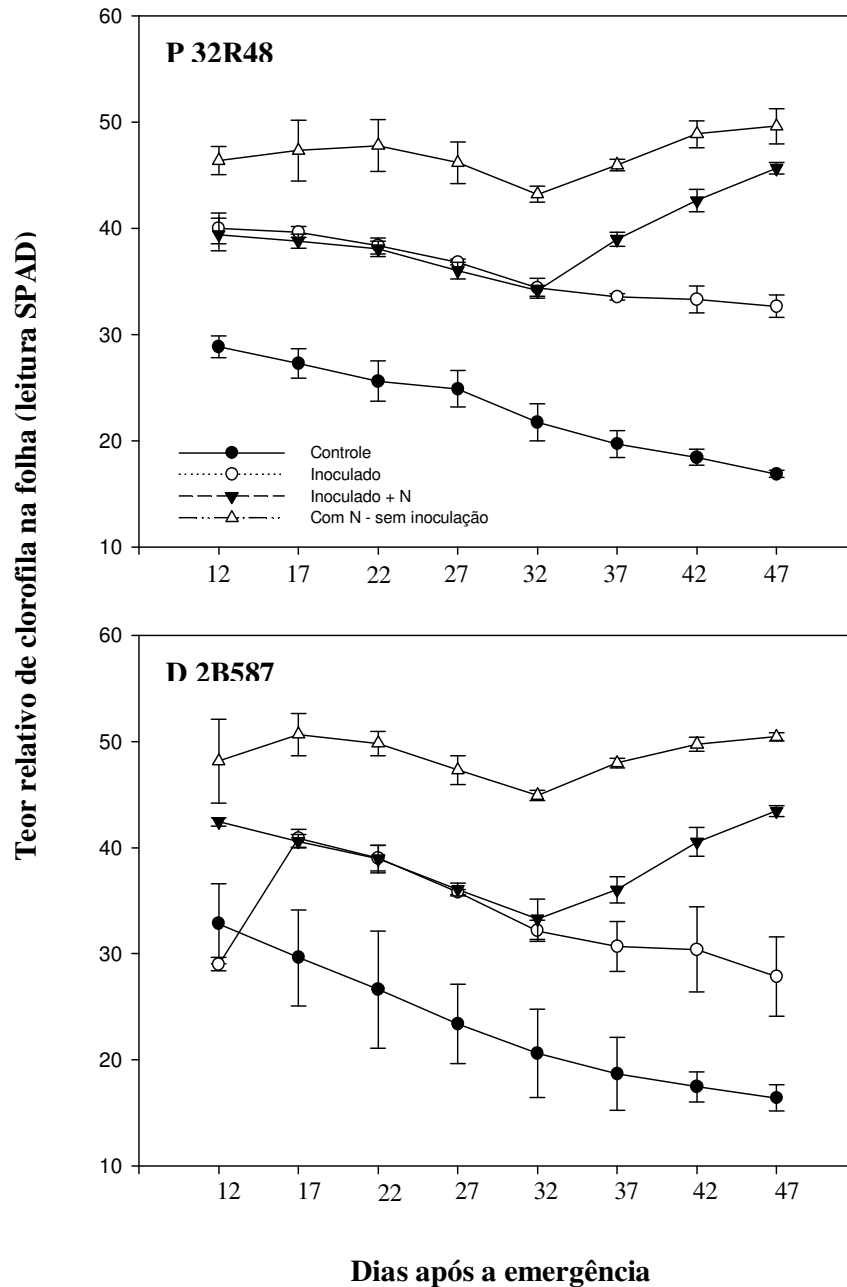


Figura 3. Teor relativo de clorofila na folha (leitura SPAD) e erro padrão entre repetições na etapa de avaliação da inoculação de três espécies de *Azospirillum* em plantas de milho, avaliado dos 12 aos 47 dias após a emergência das plantas, nos híbridos D 2B587 e P 32R48. Porto Alegre, 2007.

Estes resultados mostram indícios de que a inoculação juntamente com a aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N pode apresentar para esta característica equivalência à aplicação de 130 ha⁻¹ kg de N sem inoculação, dentro do período vegetativo avaliado.

A inoculação de *Azospirillum* na presença de pequenas doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado maior eficiência para o sistema planta/bactéria quando comparado ao uso isolado da bactéria. Didonet *et al.* (1996) observaram que a produção de grãos de trigo inoculado com a estirpe JA04 de *A. brasilense*, e complementado com 15 kg ha⁻¹ de N não diferiu estatisticamente da obtida no tratamento controle, que recebeu a adubação equivalente a 45 kg ha⁻¹ de N.

4.3 Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas

Os híbridos utilizados neste experimento foram selecionados por apresentarem alta população de diazotróficos nas raízes no primeiro experimento (inoculação de uma espécie de *Azospirillum* e seleção de cultivares), além de produzirem maior teor de matéria seca no tratamento inoculado em relação ao tratamento controle.

4.3.1 Avaliação da presença de diazotróficos

Para o NMP de bactérias presentes nas raízes e nos colmos frescos das plantas, coletadas no final do ciclo da cultura, foram considerados significativamente superiores os tratamentos inoculados onde houve crescimento mínimo na ordem de dois logaritmos (Log) em relação ao tratamento controle, visto que aumentos de ordem menor do que esta podem estar relacionados a variações no comportamento fisiológico das células, e não devido ao evento da inoculação.

O NMP variou entre Log₁₀=3 e Log₁₀=6 (Figura 4), sendo que nos tratamentos sem inoculação também foram detectadas bactérias diazotróficas, provavelmente porque estas bactérias ocorrem naturalmente no solo e a área

do experimento já vem sendo cultivada com milho em rotação com soja há 17 anos, mantendo-se desta maneira uma população de diazotróficos estável.

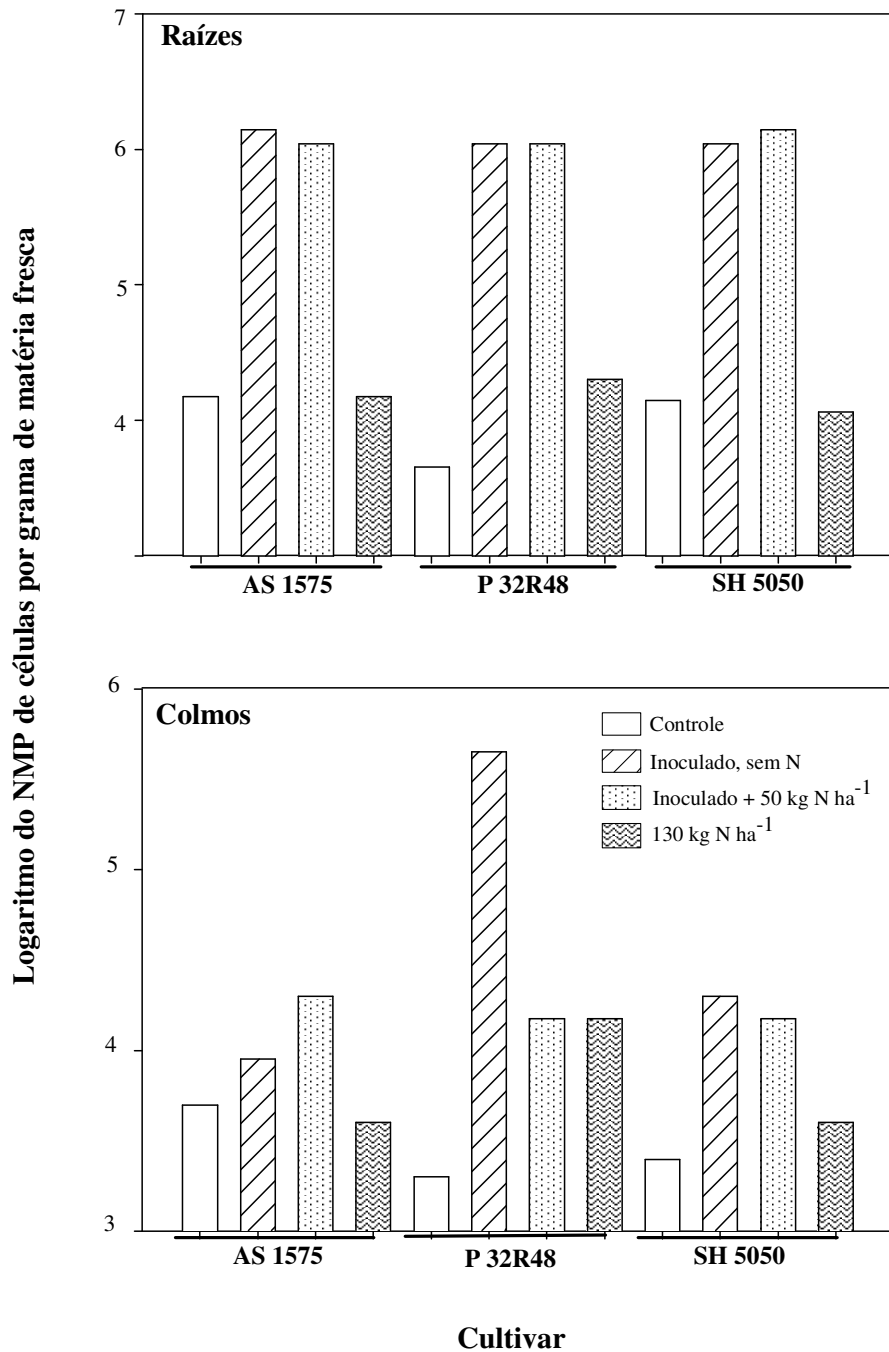


Figura 4. Logaritmo do número mais provável (NMP) de células bacterianas por grama de matéria fresca de raiz (a) e colmo (b) de milho, sob tratamentos com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.

Entretanto, a quantidade destas bactérias nas raízes nos tratamentos sem inoculação foi menor em aproximadamente 2 Log em relação aos tratamentos que foram inoculados.

Nas raízes, observou-se que os tratamentos com inoculação e com inoculação + 50 kg ha⁻¹ de N apresentaram valores de NMP semelhantes e obtiveram aumento na ordem de 2 Log em relação aos seus respectivos controles, demonstrando que a inoculação das bactérias foi efetiva quanto a colonização das plantas.

Nos colmos, o NMP por grama de matéria fresca variou entre Log₁₀=3 e Log₁₀=4, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, com exceção do híbrido P 32R48, onde observou-se um aumento da população diazotrófica de aproximadamente 3 Log no tratamento inoculado em relação ao seu tratamento controle.

A menor população detectada no colmo do milho em comparação às raízes, pode ser explicada pelo fato de que o gênero *Azospirillum* tem o sistema radicular como nicho preferencial de colonização nas plantas, e uma vez dentro do tecido das plantas, podem interagir com outras bactérias sendo que a efetivação da colonização dependerá de diferentes requerimentos energéticos de cada microrganismo (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Liu *et al.* (2006), estudando a colonização de milho e arroz por *Bacillus megaterium* observaram que esta bactéria migrou lentamente das raízes em direção ao colmo e as folhas, evidenciando que apenas poucas células bacterianas podem ser encontradas na parte aérea destas espécies.

4.3.2 Avaliação do teor relativo de clorofila na folha

O *SPAD* fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente nas folhas das plantas, constituindo-se num instrumento prático e rápido para se avaliar o teor de N foliar, visto que o teor de clorofila da folha se correlaciona positivamente com o teor de N na planta (Schadchina & Dmitrieva, 1995) e com o rendimento da cultura (Smeal & Zhang, 1994). Isso se deve ao fato de que 50 a 70% do N total das folhas serem integrantes de enzimas (Chapman & Barreto, 1997) que estão associadas aos cloroplastos. Os valores médios das seis leituras *SPAD* obtidas durante os estádios desenvolvimento de planta V₅ e R₃ foram de 31,94 no tratamento controle; 34,32 no tratamento

inoculado; 41,76 no tratamento inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e de 42,51 no tratamento com 130 kg ha⁻¹ de N (Tabela 3, Figura 5).

Tabela 3. Leitura do clorofilômetro (leitura SPAD - Soil Plant Analysis Development) realizada nas folhas das plantas, em seis estádios de desenvolvimento do milho. Eldorado do Sul / RS, 2008.

Híbrido	Leitura SPAD			
	Controle	Inoculado, sem N	Inoculado + 50 kg N ha ⁻¹	130 kg de N ha ⁻¹
		Estádio ¹ V5	(CV% = 4,04)	
P 32R48	ns ² 29,77 b	B 28,80 b	ns 35,60 a	ns 35,90 a
AS 1575	29,70 b	A 32,52 ab	35,50 a	36,52 a
SHS 5050	32,60 b	AB 31,80 ab	36,72 a	34,07 a
Média	30,69	31,04	35,94	35,49
		Estádio V7	(CV% = 6,14)	
P 32R48	ns 37,87 b	ns 41,07 ab	ns 45,37 a	ns 46,62 a
AS 1575	37,30 b	42,15 ab	47,00 a	47,60 a
SHS 5050	39,92 b	41,70 b	48,82 a	49,12 a
Média	38,36	41,64	47,06	47,78
		Estádio V10	(CV% = 7,07)	
P 32R48	ns 37,92 b	ns 36,75 b	ns 48,82 a	ns 49,37 a
AS 1575	36,90 b	37,00 b	47,37 a	50,70 a
SHS 5050	34,77 b	37,50 b	49,47 a	50,72 a
Média	36,53	37,08	48,55	50,26
		Estádio V15	(CV% = 7,67)	
P 32R48	ns 32,85 b	ns 38,87 b	ns 46,02 a	ns 46,00 a
AS 1575	30,80 b	35,10 ab	40,90 a	47,45 a
SHS 5050	31,17 b	37,22 b	46,97 a	49,05 a
Média	31,60	26,39	44,63	47,50
		Estádio R1	(CV% = 8,39)	
P 32R48	ns 28,75 b	ns 31,57 b	ns 37,85 a	ns 39,60 a
AS 1575	26,65 c	34,52 b	38,45 ab	45,15 a
SHS 5050	26,65 b	32,15 b	40,60 a	45,35 a
Média	27,35	32,74	38,96	43,36
		Estádio R3	(CV% = 9,26)	
P 32R48	ns 24,50 b	ns 28,87 b	ns 36,92 a	ns 37,57 a
AS 1575	24,30 b	31,25 b	39,15 a	42,12 a
SHS 5050	25,85 b	30,90 b	39,02 a	42,62 a
Média	24,88	30,34	38,36	40,77
Média geral	31,94	34,32	41,76	42,51

1. Vx : x = n° de folhas completamente desenvolvidas na planta ; R1 = embonecamento e polinização; R3 = grão leitoso; conforme escala de Ritchie *et al.* (1992).
ns²= não significativo.

* Médias antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que até o estágio V_7 , nos tratamentos controle e inoculado os teores relativos de clorofila da folha aumentaram, o que se deve provavelmente pela extração de N do solo e disponibilizado pela decomposição da resteva de aveia-branca, suprindo o N requerido pelas plantas neste período. Após, observou-se uma queda nos valores da leitura *SPAD* nas plantas destes tratamentos, passando de 38,36 (estádio V_7) para 31,94 (estádio R_3) no tratamento controle, e de 41,64 (estádio V_7) para 34,32 (estádio R_3) no tratamento inoculado (sem N).

No tratamento com inoculação, sem aplicação de N, os incrementos nos teores relativos de clorofila da folha não foram estatisticamente significativos em relação ao tratamento sem inoculação (controle), exceto no estágio R_1 para o híbrido AS 1575.

Nas plantas dos tratamentos que receberam adubação nitrogenada, o valor máximo de leitura no clorofilômetro ocorreu entre os estádios V_7 e V_{10} , provavelmente porque a adubação nitrogenada de cobertura ocorreu no estágio V_6 . Para esta característica, os tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N, foram estatisticamente iguais para os três híbridos em todos os estádios de desenvolvimento de planta avaliados.

Segundo Kollb & Martin (1987), a adição de N no milho tem um efeito direto sobre a exudação radicular, aumentando o fornecimento de fontes de carbono às bactérias, estimulando desta forma sua colonização e efetivação da inoculação. A inoculação de *Azospirillum* com baixas doses de aplicação de N (15 a 40 kg ha⁻¹ de N) tem mostrado maior eficiência para o sistema planta-bactéria quando comparado com o uso isolado da bactéria. Fages (1994) relata que os aumentos observados no rendimento de grãos de sete experimentos de inoculação de milho na presença de baixas doses de N aplicado, se devem a um maior desenvolvimento do sistema radicular.

4.3.3 Avaliações agronômicas dos híbridos

Quanto à característica estatura (Tabela 4), os tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N foram iguais estatisticamente nas avaliações realizadas entre os estádios de desenvolvimento V_{10} a R_2 . A estatura média final das plantas (no estágio R_2 – grão “bolha d’água) foi de 220,

224, 257 e 266 cm respectivamente, para os tratamentos controle, inoculado, inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N.

Quanto às características número total de folhas e senescência foliar (Tabela 4), não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos avaliados.

Quanto ao número de grãos por espiga (Tabela 5), os valores variaram de 146 (P 32R48 / controle) a 380 (AS 1575 / 130 kg ha⁻¹ de N) grãos por espiga. Os valores médios foram de 175, 167, 275 e 340 grãos por espiga respectivamente para os tratamentos controle, inoculado, inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N. Observou-se que a inoculação não afetou esta característica, visto que o tratamento com inoculação foi igual ao tratamento controle. Entretanto, os tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N foram superiores e iguais estatisticamente, exceto para o híbrido SHS 5050.

O peso de grãos por espiga não variou entre os tratamentos controle, inoculado e inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N (55, 56 e 84 g de grãos por espiga), sendo superior no tratamento com 130 kg ha⁻¹ de N (109 g de grãos por espiga).

Quanto ao rendimento de massa seca da parte aérea (Tabela 5), variou de 6,61 Mg ha⁻¹ para o híbrido P 32R48 no tratamento inoculado, a 15,36 Mg ha⁻¹ para o híbrido AS 1575 no tratamento inoculado + 50 kg de N ha⁻¹. Os híbridos AS 1575 e SHS 5050 no tratamento inoculado, apresentaram incremento de 1,68 e 3.77 Mg de massa seca ha⁻¹ em relação ao tratamento controle, evidenciando que a inoculação das bactérias aumentou a massa seca da parte aérea para estes híbridos. Para os híbridos AS 1575 e SHS 5050, os tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N foram iguais quanto ao rendimento de massa seca.

Reis Júnior *et al.* (2008) observaram incremento na massa seca de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* spp., e consideraram que o maior rendimento de matéria seca e o acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas sejam devidos à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Bashan & Holguin (2004) relataram que os fito-hormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum* desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral.

Tabela 4. Avaliação da estatura de plantas em quatro estádios de desenvolvimento, número total de folhas no pendoamento e senescência foliar de três híbridos de milho, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.

Híbrido	Tratamentos			
	Controle	Inoculado	Inoculado + 50 kg N ha ⁻¹	130 kg de N ha ⁻¹
Estatura (cm)				
Estádio ¹ V ₆ (CV% = 6,2)				
P 32R48	³ ns 46 ns	ns 48	ns 50	ns 54
AS 1575	45 b	38 b	52 a	59 a
SHS 5050	48 b	50 b	53 b	60 a
Média	46	45	52	58
Estádio V ₁₀ (CV% = 6,9)				
P 32R48	ns 109 b	ns 111 b	ns 139 a	ns 148 a
AS 1575	113 b	120 b	153 a	173 a
SHS 5050	126 ab	119 b	149 a	166 a
Média	116	117	147	162
Estádio V ₁₄ (CV% = 5,92)				
P 32R48	ns 168 b	ns 173 b	ns 220 a	ns 232 a
AS 1575	156 b	170 b	214 a	241 a
SHS 5050	170 b	165 b	219 a	233 a
Média	165	170	218	235
Estádio ² R ₂ (CV% = 5,1)				
P 32R48	ns 223 b	ns 219 b	ns 259 ab	ns 262 a
AS 1575	225 b	234 ab	259 a	279 a
SHS 5050	213 b	219 b	252 a	255 a
Média	220	224	257	266
Total de folhas (CV% = 3,3)				
n°				
P 32R48	ns 18 ns	ns 19	ns 19	ns 19
AS 1575	22 ns	22	22	22
SHS 5050	19 ns	20	20	20
Média	20	20	20	20
Senescência (CV% = 5,7)				
%				
P 32R48	ns 44 ns	ns 44	ns 48	ns 45
AS 1575	49 ns	53	52	53
SHS 5050	47 ns	48	48	48
Média	47	48	49	49

1. V_x : x = n° de folhas completamente desenvolvidas na planta.
2. R₂ = grão bolha d'água, conforme escala de Ritchie *et al.* (1992).
ns³= não significativo.

Médias antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto aos teores de N da massa seca da parte aérea (Tabela 5), variaram de 2,97 mg g⁻¹ (híbrido SHS 5050 no tratamento controle) a 4,42 mg g⁻¹ (híbrido AS 1575 no tratamento com 130 kg de N ha⁻¹). Para o híbrido AS 1575, os tratamentos inoculado, inoculado + 50 kg N ha⁻¹ e 130 kg de N ha⁻¹ não diferiram estatisticamente.

Tabela 5. Características agrônômicas de três híbridos de milho, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Eldorado do Sul / RS, 2008.

Híbrido	Tratamentos			
	Controle	Inoculado	Inoculado + 50 kg N ha ⁻¹	130 kg de N ha ⁻¹
Grãos / espiga (CV% = 9,9)				
n°				
P 32R48	B 146 b	B 172 b	B 252 a	B 302 a
AS 1575	A 213 b	A 204 b	A 312 a	A 380 a
SHS 5050	AB 165 c	B 125 c	AB 262 b	AB 337 a
Média	175	167	275	340
peso grãos / espiga (CV% = 12,6)				
g				
P 32R48	B 39 b	AB 55 b	B 70 b	B 98 a
AS 1575	A 77 c	A 70 c	A 104 b	A 128 a
SHS 5050	B 50 c	B 42 c	B 79 b	B 100 a
Média	55	56	84	109
Rendimento de massa seca da parte aérea ¹ (CV% = 17,0)				
Mg há ⁻¹				
P 32R48	A 7,13 ns ²	B 6,61	B 9,33	B 9,66
AS 1575	A 10,71 b	A 12,39 b	A 15,36 a	A 15,04 a
SHS 5050	A 7,12 b	A 10,89 a	AB 12,73 a	AB 12,48 a
Média	8,32	9,96	11,47	12,40
Rendimento de grãos (CV% = 14,9)				
Mg há ⁻¹				
P 32R48	B 2,87 b	ns 3,69 b	B 4,88 b	AB 7,46 a
AS 1575	A 5,27 b	4,92 b	A 7,78 a	A 9,19 a
SHS 5050	AB 3,43 b	3,09 b	B 5,69 a	B 7,15 a
Média	3,85	3,90	6,11	7,93
Teor de N na massa seca da parte aérea (CV% = 8,1)				
mg g ⁻¹				
P 32R48	ns 3,35 b	AB 3,75 ab	ns 4,10 ab	ns 4,27 a
AS 1575	3,50 b	A 4,22 a	4,15 a	4,42 a
SHS 5050	2,97 b	B 3,12 ab	3,57 ab	3,80 a
Média	3,27	3,70	3,94	4,16

1. Referente à matéria seca das folhas, colmos e espiga (sem grãos).
2. ns = não significativo.

* Médias antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O rendimento de grãos (Tabela 5) variou de 2,87 Mg ha⁻¹ (SHS 5050, tratamento controle) a 9,19 Mg ha⁻¹ (AS 1575, tratamento com 130 kg de N ha⁻¹). Para os híbridos AS 1575 e SHS 5050 os resultados foram iguais estatisticamente nos tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N e 130 kg ha⁻¹ de N, embora o tratamento com 130 kg ha⁻¹ de N tenha apresentado rendimento maior em 1,45 Mg ha⁻¹ de grãos, para os dois híbridos.

Como o experimento não contou com tratamento “ 50 kg ha⁻¹ de N, sem inoculação” (controle para o tratamento com inoculação + 50 kg ha⁻¹ de N), não é possível afirmar que a igualdade estatística dos tratamentos inoculado + 50 kg ha⁻¹ de N (somente na semeadura) e 130 kg ha⁻¹ de N (50 kg na base e 80 kg em cobertura) tenha sido devido à inoculação ou à adição de 50 kg ha⁻¹ de N na semeadura, no tratamento com inoculação. Porém, estes resultados demonstram um possível efeito da inoculação das bactérias sobre a disponibilidade de N para as plantas nos tratamentos com inoculação + 50 kg ha⁻¹ de N (na base).

Sem a aplicação do adubo nitrogenado, a inoculação das plantas de milho com bactérias diazotróficas não resultou em alteração para a maioria das características avaliadas. No caso do híbrido SHS 5050, um trabalho recente (Cavalcanti Alves, 2007) demonstrou que com a inoculação de bactérias diazotróficas das espécies *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. em milho, a campo, e pela técnica de abundância natural de ¹⁵N, o híbrido SHS 5050 recebe contribuição de 45 e 36% de N provenientes da FBN nos experimentos de safrinha e safra respectivamente.

5. CONCLUSÕES

a) O genótipo de milho influenciou na associação entre as bactérias e as plantas.

b) A inoculação de bactérias diazotróficas aumentou o volume das raízes nas cultivares avaliadas.

c) As raízes das plantas apresentaram maior população de diazotróficos do que os colmos.

d) A inoculação a campo aumentou o rendimento da massa seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050.

e) A inoculação a campo apresentou indícios de que juntamente com a adição de dose de 50 kg de N ha⁻¹ na base, apresenta desempenho equivalente à aplicação de 130 kg de N ha⁻¹ quanto ao rendimento de grãos para os híbridos AS 1575 e SHS 5050.

6. REFERÊNCIAS

- AVIVI, Y.; FELDMAN, N. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. **Isr. J. Bot.**; Jerusalem, v. 32, 237-241, 1982.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 924-929, 1983.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 234 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ. 1996.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 152, p. 643-649, 1983.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 521-577, 2004.
- BENCHIMOL, R. L., CHU, E. Y., YUITIMUTO, R., DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n° 7, p. 1343-1348. 2000.
- BENIZRIE, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**. Oxford, v. 11, p. 557-574, 2001.

- BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n.1, p. 195-209, 1995a.
- BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, Oxford, v.42, p.241-250, 1995b.
- BONIFÁCIO E SOUSA, G. W. AMA Brasil e Comissão da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural. Audiência Pública - Brasília : 02/05/2007.
- BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 11, p. 131-139, 1985.
- BURRIS, R. H. & ROBERTS, G. P. Biological nitrogen fixation. **Annu. Rev. Nutr.** V. 13, p. 317-355, 1993.
- CASSÁN, F., BOTTINI, R., SCHNEIDER, G., PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants 1. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2053–2058, 2001.
- CAVALCANTI ALVES, G. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 53 f. **2007.**
- CHAPMAN, S.C., BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v.89, n.4, p.557-562, 1997.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n° 3, p. 252-263, 2001.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** 10^a. ed. Porto Alegre, 2004.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, disponível em 10/11/2008 no endereço eletrônico <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra>
- DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 645-651, 1996.

- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155-164, 1999.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, F.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 871-879, 2001.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**. Boca Raton, v. 22, n.2, p. 107-149. 2003.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, v. 2. p. 518-538, 1976.
- DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, n.1, p. 1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA- CNPAB, 1995.
- DOMMELEN, VAN A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 2652-2659, 1998.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: SPI, 2006.
- EADY, R. R. & POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature** v. 249, p. 805-810, 1974.
- EL-DESOUK RADWAN, T. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.987-994, 2004.
- FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISHER, M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 147-153, 1988.

- FAGES, J.; MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**, Paris, v. 8, p. 309-315, 1988.
- FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. Ed. ***Azospirillum/plant associations***. Boca Raton. CRC Press. p.87-109. 1994.
- FERREIRA, D.F. Programa Sisvar. exe. **Sistema de Análises de variância**. Versão 5.0. 2003.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E., CABALLERO-MELLADO, J., SEPULVEDA, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, 117–127,, 1999.
- GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.
- GOEBEL, E. M. & KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol**, v. 159, p. 86-92, 1984.
- GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n°3, p.369-378, 1998.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HALL, P. G. & KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 47, p. 433-435, 1984.
- HARTAMAN, A. & ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum-Plant Associations* (Y. OKON, Ed.), p. 15-39. **CRC Press**, Boca Raton, 1994.
- JETIYANON, K., KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, v. 24, p. 285-291. 2002.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, p. 197-209, 2000.
- KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

- KIM, J. & REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, 33: 389-398, 1994.
- KIPE-NOLT, J.A.; AVALAKKI, U.K.; DART, P.J. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, n°6, p.859-863, 1985.
- KLOPPER, J. W., RODRIGUEZ-UBANA, R., ZEHNDER, G. W., MURPHY, J. F., SIKORA, E., FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australian Plant Pathology**, v. 28, p. 21-26. 1999.
- KOLB W. & MARTIN, P. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indolacetic acid. In: **Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology**. p. 215-221. Klingmüller, W. Ed., Springer Verlag, Berlin. 1987.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indoles-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, v. 8, p. 298-300, 2000.
- LEE, K-K, WANI, S. P; YONEYAMA, T.; TRIMURTULU, N.; HARIKRISHNAN, R. Associative N₂-fixing in pearl millet and sorghum: levels and response to inoculation. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 40, p. 477-484, 1994.
- LETHBRIDGE, G.; DAVIDSON, M. S. Root-associated nitrogen-fixing bacteria and their role in the nitrogen nutrition of wheat estimated by ¹⁵N isotope dilution. **Soil Biol. Biochemistry**, v. 15, p. 365-374, 1983.
- LIMA, E. et al. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aimed nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n.1, p. 165-170, 1987.
- LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 1775-1779, 1983.
- LIU, et al. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n° 3, p. 186-190, 2006.
- LODEWYCKX, C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E. R. B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**, v.21, n.6. p. 583-606, 2002.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. **Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria**. Antonie van Leewenhoek, Dordrecht, v. 86, p. 1-25, 2004.

- MICHIELS, K.; CROES C. L. & VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.**; Reading, v. 137, p. 2241-2246, 1991.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Ed. UFLA, Lavras, 729 p. 2006.
- MORRISSEY, J. P.; DOW, J. M.; MARK, G. L.; FERGAL O'GARA, Y. Are microbes at the root of a solution to world food production? **Nature EMBO Reports**, v 5, n° 10, p. 922 - 926, 2004.
- MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. **Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de *Azospirillum* y *Pseudomonas* fluorescentes**. In: CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO Y I ENCUESTRO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO, 3., 1991. Cuernavaca. Anais... Cuernvaca, México, p.61. 1991.
- MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N-fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils** v.29, p. 157–167, 1999.
- MYLONA, P.; PAWLOWKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **Plant Cell** v. 7, p. 869-885, 1995.
- NEHL, D.B.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996.
- NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. Nitrogen fixation: From Molecules To Crop Productivity. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht. 2000.
- OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum* na evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601. 1994.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n°7, p.366-370, 1997.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, A. L.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Relatório Técnico - Embrapa Agrobiologia - n° 161. **Processos e mecanismos na influência de**

microorganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica – RJ. 2003.

- PATRIQUIN, D. G. & DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 24, p.742, 1978.
- PENOT, I.; BERGES, N.; GUINGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmids profiles. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa. v. 38, p. 798-803, 1992.
- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 3-28, 1995.
- PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground : molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, p. 189-199, 2003.
- QUADROS, P. D. de, ROESCH, L. F. W., CAMARGO, F. A. O. **Seleção de genótipos de milho eficientes na associação com bactérias diazotróficas** In: XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, v.I. p.185 – 185, Gramado / RS, 2007.
- RADWAN, Tharwat El-sayed El-desoky; MOHAMED, Zeinat Kamel ; REIS, V. M. . Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n° 10, p. 987-994, 2004.
- RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n° 3, p. 541-554, 2004.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.** 162:190-195. 1985.
- REIS JUNIOR, F. B.; DA SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de Cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p. 985-994, 2000.
- REIS, V. M. In: FERTBIO 2006 Anais. **Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas.** (palestra) CD-ROM Bonito / MS. 2006.
- REIS JUNIOR, F. B. dos, MACHADO, C. T. DE T., MACHADO, A. T. & SODEK L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J. How a corn plant develops. **Ames : Iowa State University of Science and Technology**, 26p., 1993.
- RODRIGUES SALA, V. M.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D.; Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em Interação com a adubação nitrogenada, no campo. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1099-1106, 2008.
- ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. M. P.; SELBACH, P. A.; SACCOL DE SÁ, E. L.; e CAMARGO, F. A. de O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (DOI 10.1007/s11274-006-9142-4). Springer. 2006.
- ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D. Q.; CAMARGO, F. de O. C.; TRIPLETT, E. W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology** – v Z3; p.1377-1383, 2007.
- RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 45, n.1, p. 39-47, 2003.
- SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertilizer Soils**, Oxford, v.21, p.193-196, 1996.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopatológica**, Jaguariúna, v. 1, n°3, p.231-233, 1975.
- SAS User's guide: Statistics. **SAS Institute Inc.**, Cary, North Caroline. 1985.
- SCHADCHINA, T.M., DMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, p.1427-1437, 1995.
- SMEAL, D., ZHANG, H. **Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn**. Communications in Soil Science and Plant Analysis, New York, v.25, n.9/10, p.1495-1503, 1994.
- SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. **Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2004.
- STEENHOUDT, O. and VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.** Oct; v.24, p. 487-506, 2000.

- SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**. New York, v 12, p. 54-123, 1990.
- SWIADER, J.M.; MOORE, A. SPAD-chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, Abingdon, v. 25, n°5, p.1089-1100, 2002.
- TEDESCO, M. J. *et al.* **Análise de Solo, Plantas e Outros Materiais**. 2° edição ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174 p.
- TERVER, I. W., HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology**, v.38, p. 960-67, 2002.
- TSAGOUE, V., Kefalogianni, I., Sini, K. & Aggelis, G. Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of NH₄⁺. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p 574–578, 2003.
- UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H. & DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, Ottawa, v.39, p. 219-226, 1980.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**. v 91, p. 127-141, 2001.
- WANI, P. Inoculation with associative nitrogen-fixing bacteria: role in cereal grain production improvement. **Indian Journal of Microbiology**. New Dehli, v. 30, p. 363-393, 1990.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.
- ZHULIN, I. B.; TRETYAKOVA, S. E.; IGNATOV, V. V. Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. **Folia Microbiol**, v 33, p. 277-280, 1988.

7. ANEXOS

7.1 Meios de cultura e soluções utilizadas

Meio de cultura NFb (DÖBEREINER et al., 1995)

5,0 g L ⁻¹	Ácido málico
0,5 g L ⁻¹	K ₂ HPO ₄
0,2 g L ⁻¹	Mg SO ₄ . 7H ₂ O
0,1 g L ⁻¹	NaCl
0,02 g L ⁻¹	CaCl ₂ . 2H ₂ O
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4 mL	FeEDTA (solução 1,64%)
1 mL	Solução de vitaminas
4,5 g L ⁻¹	KOH
pH	6,5 - 6,8

Solução de micronutrientes

0,04 g L ⁻¹	CuSO ₂ . 5H ₂ O
1,20 g L ⁻¹	ZnSO ₄ . 7H ₂ O
1,40 g L ⁻¹	H ₃ BO ₃
1,00 g L ⁻¹	Na ₂ Mo ₄ . 2H ₂ O
1,175 g L ⁻¹	MnSO ₄ . 2H ₂ O

Solução de vitaminas (DÖBEREINER et al., 1995)

10 mg 100 mL⁻¹ Biotina

20 mg Pirridoxol – HCl

Meio Dygs (DÖBEREINER et al., 1995)

2 g L⁻¹ Glicose

2 g L⁻¹ Ácido málico

1,5 g L⁻¹ Peptona bacteriológica

2 g L⁻¹ Extrato de levedura

0,5 g L⁻¹ K₂HPO₄

0,5 g L⁻¹ Mg SO₄. 7H₂O

1,5 g L⁻¹ Ácido glutâmico

pH 6,5 6,5

Solução para preservação de isolados

10 g Leite em pó

10 mL Glicerol

90 mL Água

Solução salina para diluição (DÖBEREINER et al., 1995)

3,4 g L⁻¹ KH₂HPO₄

0,2 g L⁻¹ MgSO₄. 7H₂O

0,1 g L⁻¹ NaCl

0,02 g L⁻¹ CaCl₂. 2H₂O

2 mL Solução de micronutrientes

4 mL FeEDTA (solução 1,64%)

4,5 g L⁻¹ KOH

pH 7,0

Solução nutritiva (SARRUGE, 1975)

N	210 mg L ⁻¹
P	31 mg L ⁻¹
K	234 mg L ⁻¹
Ca	200 mg L ⁻¹
Mg	48 mg L ⁻¹
S	64 mg L ⁻¹
B	0,5 mg L ⁻¹
Cu	0,02 mg L ⁻¹
Fe	5,0 mg L ⁻¹
Mn	0,5 mg L ⁻¹
Zn	0,05 mg L ⁻¹
Mo	0,01 mg L ⁻¹

7.2 Registro fotográfico

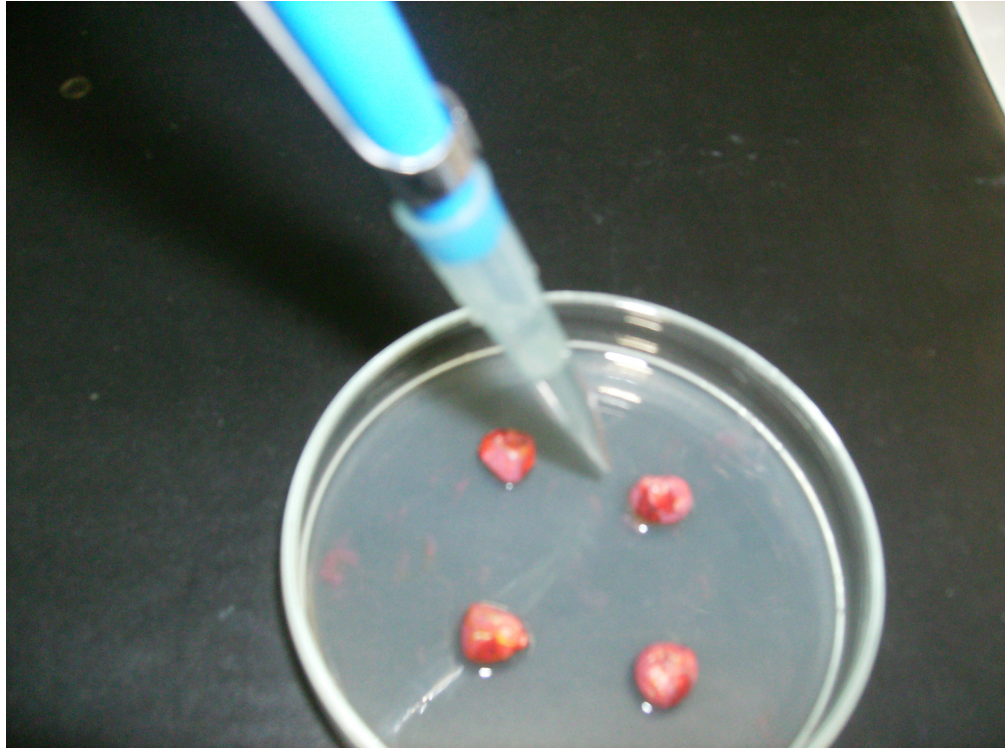


Foto 1. Inoculação das sementes “*in vitro*”



Foto 2. Experimento de inoculação e seleção de cultivares de milho eficientes na associação com uma linhagem de *Azospirillum* (primeira etapa).



Foto 3. Experimento a campo (resteva de aveia-branca) após a demarcação das linhas de cultivo e adubação com P e K.



Foto 4. Experimento a campo, plantas com 3-4 folhas, antes do desbaste.



Foto 5. Experimento a campo, 30 DAE das plantas.



Foto 6. Leitura do teor relativo de clorofila na folha com o aparelho clorofilômetro.



Foto 7. Experimento a campo, 50 DAE das plantas.



Foto 8. Experimento a campo, 50 DAE das plantas (visível diferença entre parcelas / tratamentos).



Foto 9. Colheita do experimento a campo.

8. VITA

Patrícia Dörr de Quadros, filha de Valdir Pappis de Quadros e Nilse Delsi Dörr de Quadros, nasceu em 11 de abril de 1975, em Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul. Estudou na escola Coração de Maria / Esteio e La Salle / Canoas, onde completou seus estudos de primeiro e segundo graus respectivamente. Em 2000 ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, graduando-se como Engenheiro-Agrônomo em 2007. Em março de 2008 iniciou seus estudos de Mestrado em Ciência do Solo no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)