

## **Inoculação com *Azospirillum brasilense* Via Foliar Associada à Doses de Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho**

José Roberto Portugal<sup>1\*</sup>, Orivaldo Arf<sup>1</sup>, Walter Vagaes Longui<sup>1</sup>, Douglas de Castilho Gitti<sup>1</sup>, Marla Karyne Felippi Barbieri<sup>1</sup>, Alex Rangel Gonzaga<sup>1</sup> e Donário Silva Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP - Ilha Solteira, SP.\* [jrp\\_agro@yahoo.com.br](mailto:jrp_agro@yahoo.com.br)

**RESUMO** - O trabalho teve o objetivo de verificar a performance agrônômica da cultura do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar, associada à aplicação de nitrogênio em cobertura. O experimento foi conduzido no município de Selvíria – MS, durante o ano agrícola 2011/12. O experimento foi constituído por oito tratamentos em blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial 4x2, sendo quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>), na presença e ausência de *A. brasilense* (200 ml ha<sup>-1</sup>) aplicado via foliar no estágio de desenvolvimento V<sub>6</sub>. Foi utilizado o híbrido AG 8088 YG, semeado no espaçamento de 0,90 m entrelinhas. Foram avaliados os componentes de produção e a produtividade do milho. A inoculação via foliar do *Azospirillum brasilense* proporcionou maior teor de N foliar, população final de plantas e produtividade de grãos. A inoculação via foliar de *Azospirillum brasilense* pode ser uma opção para o produtor que não pode realizá-la via semente.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Azospirillum brasilense*, adubação nitrogenada, produtividade.

### **Introdução**

A utilização de insumos biológicos tem ocorrido com maior frequência na agricultura, substituindo os insumos químicos industrializados. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem se mostrado indispensável para a sustentabilidade da agricultura, visando o fornecimento de nitrogênio às culturas com baixo custo econômico e impacto ambiental reduzido (HUNGRIA et al., 2007).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas. As bactérias diazotróficas mais estudadas como BPCPs associativas, são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (BASHAN & BASHAN, 2005).

Vários trabalhos com *Azospirillum* spp tem demonstrado aumento na produtividade de grãos de milho (HUNGRIA et al., 2010). Entretanto, resultados da interação bactérias diazotróficas e milho em termos de potencial agrônômico, fixação de nitrogênio ou promoção do crescimento, depende de muitos fatores bióticos e ambientais, tais como genótipo da planta, comunidade microbiológica do solo e disponibilidade de nitrogênio (ROESCH et al., 2006).

Na cultura do milho a adubação nitrogenada apresenta grande importância, pois, o N é um dos nutrientes que apresenta os efeitos mais relevantes no aumento da produção de grãos (FERNANDE et al., 2008), é um nutriente requerido em grandes quantidades pela planta.

Com base no exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho agrônômico da cultura do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à aplicação de nitrogênio em cobertura.

### Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no ano agrícola de 2011/12, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, localizada no município de Selvíria - MS (latitude 22 ° 23 ' S e longitude 51 ° 27 ' W), com precipitação pluvial média anual de 1.300 mm, temperatura média de 23,7 °C e tipo climático A<sub>w</sub>, segundo a classificação de Köppen. O solo é classificado, de acordo com Embrapa (2006), em LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico argiloso, cuja análise química na camada de 0,0 – 0,2 m indicam os seguintes valores: MO: 21 g dm<sup>-3</sup>; pH (CaCl<sub>2</sub>): 5,2; P (resina): 11 g dm<sup>-3</sup>; K, Ca, Mg, H+Al e CTC: 3,0, 15, 10, 19 e 47 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente; e V: 59%. O preparo do solo foi realizado com escarificador e com grade niveladora. Foi utilizado o sistema de semeadura convencional, sendo a soja como cultura anterior.

Os tratamentos foram constituídos de quatro doses de nitrogênio na forma de sulfato de amônio (0, 30, 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>), na presença e ausência do inoculante aplicado via foliar. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 8 tratamentos dispostos em esquema fatorial 4x2. As parcelas foram constituídas de 5 linhas de 4,5 m de comprimento, sendo consideradas como área útil as 2 linhas centrais.

Foi utilizado o híbrido simples AG 8088 YG, de ciclo precoce e grão duro alaranjado. A inoculação via foliar foi realizada com inoculante Masterfix Gramineas<sup>®</sup> com as estirpes AbV<sub>5</sub> e AbV<sub>6</sub> de *A. brasilense* (2x10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>) na dose de 200 mL ha<sup>-1</sup>. A semeadura foi realizada no dia 09/11/2011, com espaçamento de 0,90 m entrelinhas e adubação no sulco de semeadura com 400 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 04-30-10.

A inoculação via foliar da bactéria, bem como a adubação de cobertura foram realizadas quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento V<sub>6</sub> (seis folhas expandidas), nessa fase a cultura se encontrava com 17 DAE (dias após a emergência), sendo que ambos realizados no final da tarde. Foi utilizado pulverizador costal com ponta de jato cone vazio e vazão de 180 L ha<sup>-1</sup>.

No intuito de manter a cultura livre da competição com plantas daninhas, aplicou-se atrazina e tembotriona, nas doses de 1.000 e 100 g ha<sup>-1</sup> do i.a., respectivamente, em forma de mistura de tanque. Adicionou-se na calda de aplicação o adjuvante éster metilado de óleo de soja (500 g ha<sup>-1</sup> do i.a.). A aplicação foi realizada mediante o uso de pulverizador de barras

tratorizado munido com bicos contendo pontas do tipo jato plano (“leque”) e regulado para aplicar 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.

Por ocasião do florescimento, ou seja, aos 52 DAE, foi realizada a estimativa do teor de clorofila foliar com a utilização do clorofilômetro portátil (modelo CFL 1030), que por meio de sensores, analisa três faixas de frequência de luz e através de relações de absorção de diferentes frequências, fornece medições dos teores das clorofilas a, b e total (a+b), expressas em unidades dimensionais chamadas ICF (Índice de Clorofila Foliar), sendo realizada as leituras no terço médio de 5 folhas opostas e abaixo da espiga principal, nas duas linhas centrais de cada parcela. Foram coletados os terços médios das mesmas 5 folhas por parcela, visando a avaliação do N foliar em laboratório. Na fase R<sub>3</sub> (grãos pastosos), foram realizados em cinco plantas as avaliações de diâmetro de colmo (segundo internódio a partir da base da planta), altura de plantas e altura de inserção de espiga. A colheita foi realizada no dia 15/03/2012, aos 120 DAE.

Os resultados foram submetidos ao teste F da análise de variância, comparando-se as médias dos tratamentos com *A. brasilense* pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias de doses de N em cobertura foram submetidas à análise de regressão, ajustando-se modelos de equações significativas pelo teste F.

### **Resultados e Discussão**

A inoculação via foliar da bactéria *A. brasilense* em plantas de milho, bem como a adubação nitrogenada em cobertura, não influenciaram no índice de clorofila foliar (Tabela 1). Uma possível explicação da não identificação dos tratamentos no teor de clorofila, segundo Dwyer et al. (1995) quando a planta absorve quantidade excessiva de N, esse acumula-se na forma de nitrato, dessa maneira, o N não se associa à molécula de clorofila, sendo assim, não é detectado pelo medidor de clorofila.

Em relação ao teor de N foliar (Tabela 1), observa-se que a presença da bactéria *A. brasilense* proporcionou aumento no teor desse nutriente na planta. Esse aumento deve ser em resposta da fixação biológica de nitrogênio e do aumento de volume do sistema radicular promovida pela bactéria, permitindo assim que a planta explore maior volume de solo e, conseqüentemente, maior concentração de N na folha. Os teores de N foliar variaram de 32,20 à 35,13 g kg<sup>-1</sup> matéria seca. Os teores adequados de N nas folhas, segundo Raij et al. (1996), são de 27 a 35 g de N kg<sup>-1</sup>.

Todos os tratamentos não influenciaram no diâmetro de colmo e na altura de plantas (Tabela 1). Quanto ao diâmetro do colmo, segundo Meira et al. (2009), não foi encontrada

diferença significativa para as combinações de doses de N. Em relação à altura, de acordo com Escosteguy et al. (1997) não encontraram diferenças significativas entre doses de aplicação do N na altura das plantas.

Houve interação entre a inoculação e as doses de N em cobertura para altura de inserção de espiga (Tabela 1), os dados estão apresentados na Tabela 2. Somente na dose de 0 kg ha<sup>-1</sup> de N que a presença de inoculação favoreceu à maior altura de inserção de espiga. As perdas e a pureza dos grãos na colheita mecanizada são diretamente influenciadas pela altura das plantas e, principalmente, pela altura de inserção da primeira espiga. Assim, plantas com inserção de espigas mais altas apresentam vantagens na colheita (POSSAMAI, et al., 2001). Houve comportamento quadrático da altura de inserção de espiga em resposta às doses de N em cobertura. O modelo permitiu afirmar que na ausência de inoculação, a aplicação de N em cobertura na dose de 74,5 kg ha<sup>-1</sup> proporcionou a máxima altura de inserção de espiga, apresentando um coeficiente de regressão (R<sup>2</sup>) de 98%.

A inoculação via foliar da bactéria *A. brasilense* em milho proporcionou maior população final de plantas (Tabela 3). Os dados obtidos discordam dos valores encontrados por Novakowski et al. (2011), que obtiveram população de plantas de milho inferiores quando se fez a inoculação com *A. brasilense*. As doses de N aplicadas em cobertura não tiveram influência sobre a população final de plantas.

Em relação ao número de fileiras de grãos por espiga (FG) (Tabela 3), tanto a inoculação quanto as doses de N aplicadas em cobertura não tiveram influência significativa. Em estudo realizado por Kappes (2009), mostrou que não houve diferença entre os tratamentos para a variável FG, por ser uma característica genética comandada por vários genes e pouco influenciada por fatores edafoclimáticos e de manejo.

Os valores médios de diâmetro, comprimento de espiga e massa de mil grãos (Tabela 3) indicaram que a inoculação, bem como as doses de N aplicadas em cobertura não apresentaram diferença. Segundo Ohland et al. (2005) avaliando o manejo da adubação nitrogenada no milho em sistema plantio direto não verificaram diferença para o diâmetro e comprimento de espiga. Gomes et al. (2007) também não verificaram efeito sobre a massa de mil grãos com o aumento da dose de N aplicada na cultura.

A inoculação via foliar no milho da bactéria *A. brasilense* proporcionou maior produtividade, as doses de N aplicadas em cobertura não refletiram em diferenças significativas (Tabela 3). A produtividade do milho com a utilização da bactéria *A. brasilense* foi incrementada em 868 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, aumento de 14,75%. Provavelmente, a inoculação via foliar do *A. brasilense* proporcionou maior produtividade devido à fixação biológica de N,

indicada pelo aumento no teor de N foliar, também pela promoção do maior crescimento do sistema radicular, fazendo com que as raízes explorassem maior volume de solo, aumentando a absorção de nutrientes e de água. Os dados obtidos concordam com os de Barros Neto (2008), que utilizando *A. brasiliense* em um experimento com milho, obteve aumento no rendimento de grãos de 9021 kg ha<sup>-1</sup> para 9814 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, produtividade média estatisticamente 9% superior a testemunha não inoculada. A cultura antecessora do presente trabalho foi a soja, uma leguminosa eficiente na fixação biológica de nitrogênio, na qual permite a disponibilidade de um residual de N no solo, isso pode ter influenciado para que as doses de N aplicadas em cobertura não refletissem em diferença significativa na produtividade.

### Conclusões

O teor de N foliar, população final de plantas e a produtividade de grãos foram maiores quando houve a utilização da bactéria. A inoculação via foliar de *Azospirillum brasiliense* pode ser uma opção para o produtor que não pode realizá-la via semente.

### Literatura Citada

BARROS NETO, C. R. de. Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho. 2008. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.

BASHAN, Y. e de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D. Encyclopedia of soil in the environment. Oxford, Elsevier, 2005. p.103-115.

DWYER, L.M.; ANDERSON, A.M.; MA, B.L.; STEWART, D.W.; TOLLENAAR, M. e GREGORICH, E. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. Canadian Journal of Plant Science, 75:179-182, 1995.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

ESCOSTEGUY, P. A. V.; RIZZARDI, M. A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v. 21, p. 71-77, 1997.

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L.; TRIVELIN, P. C. O. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho e utilização do N residual pela sucessão aveia preta - milho. Ciência Rural, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1138-1141, 2008.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produtobrasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

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

KAPPES, C. et al. Influência do nitrogênio no desempenho produtivo do milho cultivado na segunda safra em sucessão à soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia*, v. 39, n. 3, p. 251-259, jul./set. 2009.

MEIRA, F.A.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; SÁ, M.E. e ANDRADE, J.A.C. Fontes e Épocas de Aplicação do Nitrogênio na Cultura de Milho Irrigado. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, V.30, n.2, p.275-284, abr/jun. 2009.

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

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

POSSAMAI, J. M. et al. Sistemas de preparo do solo para o cultivo do milho safrinha. *Bragantia*, v. 60, n. 2, p. 79-82, 2001.

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

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

**Tabela 1.** Valores médios de índice de clorofila foliar (ICF), nitrogênio foliar (N), diâmetro de colmo (DC), altura de planta (AP) e altura de inserção de espiga (AE) de milho em função da inoculação via foliar com *A. brasilense* e aplicação de nitrogênio em cobertura. Selvíria (MS), 2011/12.

| Tratamentos            | ICF   | N foliar<br>(g kg <sup>-1</sup> ) | DC<br>— mm —       | AP<br>—— cm ——     | AE                 |                    |
|------------------------|-------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Inoculação (I)         |       |                                   |                    |                    |                    |                    |
| Presença               | 70,93 | 34,35 a                           | 25,25              | 187,26             | 104,34             |                    |
| Ausência               | 71,75 | 33,46 b                           | 24,52              | 189,41             | 105,22             |                    |
| Dose de N (D)          |       |                                   |                    |                    |                    |                    |
| 0 kg ha <sup>-1</sup>  | 67,58 | 32,20 <sup>(2)</sup>              | 24,26              | 188,42             | 102,47             |                    |
| 30 kg ha <sup>-1</sup> | 71,90 | 34,65                             | 24,48              | 189,72             | 106,10             |                    |
| 60 kg ha <sup>-1</sup> | 74,20 | 33,65                             | 24,98              | 189,80             | 105,97             |                    |
| 90 kg ha <sup>-1</sup> | 71,66 | 35,13                             | 25,82              | 185,40             | 104,57             |                    |
| Teste F <sup>(1)</sup> | I     | 0,26 <sup>NS</sup>                | 7,50**             | 2,33 <sup>NS</sup> | 1,21 <sup>NS</sup> | 0,34 <sup>NS</sup> |
|                        | D     | 2,91 <sup>NS</sup>                | 15,95**            | 2,11 <sup>NS</sup> | 1,10 <sup>NS</sup> | 1,23 <sup>NS</sup> |
|                        | IxD   | 0,86 <sup>NS</sup>                | 1,55 <sup>NS</sup> | 1,44 <sup>NS</sup> | 0,57 <sup>NS</sup> | 3,69*              |
| CV (%)                 | 6,39  | 2,70                              | 5,43               | 2,94               | 4,10               |                    |

<sup>(1)</sup> Teste F: \*\* e \* – significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente e <sup>NS</sup> – não significativo; Médias seguidas por letra distinta nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação. <sup>(2)</sup>  $y = 32,74 + 0,026x$ .

**Tabela 2.** Altura de inserção de espiga (cm) em plantas de milho em função da aplicação de *A. brasilense* via foliar e doses de nitrogênio aplicado em cobertura. Selvíria (MS), 2011/12.

| Inoculação | Doses de N |         |         |         | Equação de regressão              | R <sup>2</sup> |
|------------|------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|----------------|
|            | 0          | 30      | 60      | 90      |                                   |                |
| Presença   | 106,1 a    | 105,5 a | 104,0 a | 101,6 a | não significativa                 | –              |
| Ausência   | 98,8 b     | 106,6 a | 107,9 a | 107,5 a | $y = 99,04 + 0,298x - 0,002x^2$ * | 0,98           |

\* – significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas por letra distinta nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Valores médios de população final de plantas (PF), número de fileiras de grãos por espiga (FG), diâmetro (DE) e comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD) de milho em função da inoculação via foliar com *A. brasilense* e aplicação de nitrogênio em cobertura. Selvíria (MS), 2011/12.

| Tratamentos               | PF<br>(plantas ha <sup>-1</sup> ) | FG<br>– n° –       | DE<br>—— mm ——     | CE                 | MMG<br>— g —       | PROD<br>kg ha <sup>-1</sup> |                    |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| Inoculação (I)            |                                   |                    |                    |                    |                    |                             |                    |
| Presença                  | 43595 a                           | 17,47              | 49,50              | 17,88              | 314,00             | 6.751 a                     |                    |
| Ausência                  | 40972 b                           | 17,61              | 49,97              | 17,75              | 314,62             | 5.883 b                     |                    |
| Doses de N (D)            |                                   |                    |                    |                    |                    |                             |                    |
| 0 kg ha <sup>-1</sup>     | 43518                             | 17,52              | 49,44              | 178,00             | 306,19             | 6.273                       |                    |
| 30 kg ha <sup>-1</sup>    | 41666                             | 17,47              | 49,25              | 176,12             | 312,95             | 6.353                       |                    |
| 60 kg ha <sup>-1</sup>    | 41512                             | 17,62              | 49,96              | 179,87             | 319,44             | 6.172                       |                    |
| 90 kg ha <sup>-1</sup>    | 42438                             | 17,55              | 50,29              | 178,54             | 318,65             | 6.470                       |                    |
| Valor de F <sup>(1)</sup> | I                                 | 4,90*              | 0,51 <sup>NS</sup> | 2,72 <sup>NS</sup> | 1,92 <sup>NS</sup> | 0,02 <sup>NS</sup>          | 8,07**             |
|                           | D                                 | 0,60 <sup>NS</sup> | 0,11 <sup>NS</sup> | 2,71 <sup>NS</sup> | 2,83 <sup>NS</sup> | 2,20 <sup>NS</sup>          | 0,17 <sup>NS</sup> |
|                           | IxD                               | 2,60 <sup>NS</sup> | 0,14 <sup>NS</sup> | 1,48 <sup>NS</sup> | 3,55 <sup>NS</sup> | 0,26 <sup>NS</sup>          | 0,70 <sup>NS</sup> |
| CV (%)                    | 7,93                              | 3,10               | 1,65               | 1,47               | 3,72               | 13,69                       |                    |

<sup>(1)</sup> Teste F: \*\* e \* – significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente e <sup>NS</sup> – não significativo; Médias seguidas por letra distinta nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.