

Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*

Tâmara Prado de Moraes^{1*}, Césio Humberto de Brito¹, Adão de Siqueira Ferreira¹, José Magno Queiroz Luz¹

<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562060012>

RESUMO

O nitrogênio (N) é um macronutriente que aumenta a produção de grãos na cultura do milho e o seu manejo adequado torna-se indispensável como proposta de uma agricultura sustentável, incluindo o uso de fontes alternativas como bactérias fixadoras de N₂. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta morfofisiológica de plantas de milho e a atividade de enzimas no solo (urease e fosfatase) decorrente da adubação N mineral e da inoculação com *Azospirillum brasilense*. Dois ensaios foram realizados em condições de casa de vegetação com solo de cerrado. O delineamento estatístico adotado foi o de blocos ao acaso com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 3, sendo o primeiro fator correspondente a doses de N (0; 100 e 200 kg ha⁻¹) e o segundo, a doses de um inoculante líquido à base de *A. brasilense* aplicado via sementes (0; 100 e 200 mL ha⁻¹). Ao final desse experimento, outro ensaio foi realizado para verificar o possível efeito residual da inoculação e da adubação nitrogenada. A adição de fertilizantes nitrogenados promoveu maior desenvolvimento das plantas de milho, elevou os teores de clorofila e de nutrientes. Houve aumento da atividade das enzimas relacionadas à disponibilização de amônio e fósforo inorgânico na rizosfera. Além disso, o nitrogênio apresentou efeito residual no desenvolvimento das plantas na semeadura subsequente. A dose de 200 mL ha⁻¹ de *A. brasilense* associada à dose de 200 kg ha⁻¹ de N aumentou a resposta fisiológica da cultura.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactéria diazotrófica, doses de nitrogênio, atividade enzimática.

ABSTRACT

Morphophysiological aspects of maize and soil biochemistry in response to nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*

Nitrogen (N) is a macronutrient that increases grain yields in maize crops, thus appropriate management is crucial for a sustainable agriculture, including the use of alternative resources such as diazotrophic bacteria. The aims of this work were to evaluate morphophysiological aspects of maize and the activity of soil enzymes (urease and fosfatase) in response to mineral N fertilization and *Azospirillum brasilense* inoculation. Two trials were conducted under greenhouse conditions with cerrado soil. The experiment was arranged in a 3 x 3 factorial randomized block design. The first factor corresponded to N rates (0; 100 and 200 kg ha⁻¹) and the second factor to the use of the *A. brasilense* inoculant (0; 100 and 200 mL ha⁻¹). At the end of this experiment, another trial was carried out to determine the possible residual effect of the inoculation and the nitrogen fertilization. Nitrogen application promoted the growth of the maize plants and increased chlorophyll and nutrient contents. Intensified activity of rhizosphere

Submetido em 11/11/2013 e aprovado em 25/08/2015.

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. morais_prado@hotmail.com; cesiohumberto@iciag.ufu.br; adaosferreira@yahoo.com.br; jmagno@umarama.ufu.br

*Autora para correspondência: morais_prado@hotmail.com

enzymes related to ammonium and inorganic phosphorus availability was also observed. In addition, N fertilization had residual effect on plant development in the test evaluating the residual effect of the fertilizer. The combination of 200 mL ha⁻¹ of *A. brasilense* with 200 kg ha⁻¹ of N increased the physiological response of the maize crop.

Key words: *Zea mays* L., diazotrophic bacteria, nitrogen rates, enzymatic activity.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado em todo o mundo, depois do arroz e do trigo (Awika, 2011), destacando-se o Brasil como um dos principais países produtores. Apesar disto, a produção brasileira, estimada em 79 milhões de toneladas, está muito abaixo das esperadas na China e nos Estados Unidos, equivalentes a 225 e 348 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2015). Isto ocorre uma vez que no Brasil os níveis de produtividade média de milho são muito baixos.

Para incrementar a produtividade nacional torna-se imprescindível o fornecimento de nitrogênio (N) à cultura via adubações (Souza, 2006). Em adição ao uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, muitas pesquisas têm avaliado o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas no crescimento e produtividade de plantas de milho (Cantarella & Duarte, 2004; Conceição *et al.*, 2009).

Dentre os micro-organismos fixadores de N encontrados em associações com gramíneas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados. Além da capacidade de fixar N atmosférico, podem sintetizar fitohormônios (Cassán *et al.*, 2011), atuar na solubilização de fosfato inorgânico (Verma *et al.*, 2001) e estimular o desenvolvimento do sistema radicular (Lambrecht *et al.*, 2000).

Resultados positivos da associação entre *Azospirillum* e milho têm sido demonstrados por vários autores, sendo que a inoculação, na maioria dos casos, promoveu aumento de produção e/ou de matéria seca e acúmulo de N nas plantas (Okon & Labandera-González, 1994; Salamone & Döbereiner, 1996). O sucesso dessas pesquisas, no entanto, depende de diversos fatores bióticos e abióticos (Okon & Labandera-González, 1994; Hungria, 2011). Dentre esses fatores, cita-se a adubação nitrogenada. Postula-se que quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado a contribuição das bactérias diazotróficas pode ser alterada (Chela *et al.*, 1993; Dobbelaere *et al.*, 2003).

Assim, estudos sobre o potencial uso dessa bactéria em promover o crescimento de plantas de milho quando em associação com a adubação nitrogenada devem ser

conduzidos permitindo uma melhor eficiência no uso desta tecnologia. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta morfofisiológica de plantas de milho e a atividade de enzimas no solo (urease e fosfatase) decorrente da adubação N mineral e da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

MATERIAL E MÉTODOS

O primeiro experimento foi realizado em condições de casa de vegetação no Instituto de Ciências Agrárias da UFU em Uberlândia – MG. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 3, com cinco repetições em parcelas formadas por dois vasos de plástico (com capacidade de 2 L cada um e com drenos), com uma planta de milho por vaso. O primeiro fator correspondeu a doses de N (0; 100 e 200 kg ha⁻¹) e o segundo, a doses de um inoculante líquido à base de *A. brasilense* aplicado via sementes (0; 100 e 200 mL ha⁻¹).

O solo para preenchimento dos vasos foi coletado em área previamente cultivada com soja. Trata-se de um Latossolo Vermelho Distrófico (Santos *et al.*, 2013) de textura muito argilosa (685 g de argila kg⁻¹ de solo). Na profundidade de 0-20 cm, o solo apresentou as seguintes características químicas: pH em H₂O: 5,9; matéria orgânica: 3,0 dag kg⁻¹; fósforo (P me^h): 4,1 mg dm⁻³; potássio (K⁺): 0,2 cmol_c dm⁻³; cálcio (Ca²⁺): 2,2 cmol_c dm⁻³; magnésio (Mg²⁺): 1,2 cmol_c dm⁻³; alumínio (Al³⁺): 0,0 cmol_c dm⁻³; H+Al: 2,7 cmol_c dm⁻³; T: 6,3 cmol_c dm⁻³; SB: 3,6 cmol_c dm⁻³ e V: 57%.

Os vasos foram previamente desinfestados com solução contendo 40% de álcool + 10% de formol + 20% de hipoclorito de sódio e colocados para secar ao ar. O solo coletado foi destorroado, seco ao ar, peneirado e acondicionado nos vasos. Cada vaso foi preenchido com volume de 2 dm³ de solo.

A adubação de base consistiu da aplicação das fontes superfosfato triplo (37% de P₂O₅), cloreto de potássio (58% de K₂O) e sulfato de amônio (20% de N) (nos tratamentos com fertilizante nitrogenado), fornecendo doses equivalentes a 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅, 50 kg ha⁻¹ de K₂O e 50 kg ha⁻¹ de N. Os adubos foram distribuídos no solo a 5 cm da superfície.

A inoculação do híbrido de milho com *A. brasilense* foi realizada via sementes, com auxílio de sacos plásticos, utilizando o produto comercial MASTERFIX®L Gramíneas. A mistura foi cuidadosamente realizada para garantir que a distribuição do inoculante líquido nas sementes fosse uniforme. Este inoculante contém estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL⁻¹. As doses do inoculante foram equivalentes a 100 mL ha⁻¹ (dose recomendada pelo fabricante) e 200 mL ha⁻¹, além do controle sem inoculação. Após homogeneização, as sementes inoculadas foram mantidas por quatro horas em local protegido do sol até o momento da semeadura, a qual foi efetuada com três sementes por vaso a 3 cm de profundidade. O desbaste foi realizado 10 dias após a semeadura, mantendo-se uma planta por vaso.

Para o controle de plantas infestantes foram realizadas, sempre que necessário, catações manuais. A adubação de cobertura foi realizada quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento V₄, com cloreto de potássio (58% de K₂O) e nitrato de amônio (32% de N) em doses equivalentes a 150 kg ha⁻¹ de K₂O e, de acordo com o tratamento, 50 e 150 kg ha⁻¹ de N.

Após avaliações, o solo de cada vaso foi homogeneizado e peneirado, procedendo-se à nova semeadura do mesmo híbrido de milho, porém, sem inoculação das sementes e tampouco com aplicação de fertilizantes. Todos os procedimentos de condução e avaliação foram realizados da mesma maneira que no experimento anterior. No entanto, reitera-se que os tratamentos consistiram apenas do residual daqueles apresentados.

Nos dois ensaios, aos 40 dias após a semeadura, analisaram-se: altura da planta (cm), diâmetro de caule (mm), teor relativo de clorofila (ICF), volume de raízes (mL), massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g), teor de nitrogênio e de fósforo (g kg⁻¹) e atividade das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

A altura das plantas de milho foi determinada com auxílio de uma trena e compreendeu a distância entre a região do colo e a inserção da última folha completamente desenvolvida. Na região do colo, determinou-se também o diâmetro do caule com um paquímetro digital, considerando-se o maior diâmetro do colmo.

O teor relativo de clorofila na folha foi determinado utilizando-se um clorofilômetro eletrônico, marca clorofilômetro modelo CFL 1030, o qual foi operado conforme as instruções do fabricante. Neste aparelho as unidades de mensuração, denominadas Índice de Clorofila Falker (ICF), são estimadas pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha em três regiões de comprimento de onda (635; 660 e 880 nm). As leituras foram realizadas no terço superior da última folha completamente expandida de cada planta, com duas leituras por planta.

As massas da matéria fresca da parte aérea e raízes foram obtidas após lavagem do sistema radicular em água corrente e posterior separação das partes (aérea e radicular) com um corte na altura do colo, sendo pesadas em uma balança com sensibilidade de 0,01 g.

Para determinação do volume de raízes das plantas de milho, as mesmas foram submersas em proveta contendo água. O volume foi determinado pela diferença entre os volumes inicial e final do recipiente.

Posteriormente, as raízes e a parte aérea foram lavadas em água corrente, seguida da imersão em solução de água + detergente neutro e novo enxágue com água corrente. Após, raízes e parte aérea foram submersas em solução de HCl:água (1:1) e enxaguadas com água deionizada. Este procedimento de lavagem foi realizado para remoção de quaisquer impurezas das amostras vegetais. As amostras foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar a 65-70 °C até peso constante, para determinação da massa seca.

Para quantificação de N e de P, as amostras secas passaram, respectivamente, por processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação (N-Kjeldahl), e por espectrofotometria com amarelo-de-vanadato, de acordo com as metodologias descritas no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009).

Os produtos da atividade das enzimas urease e fosfatase ácida, no solo, foram determinados por absorbância utilizando-se os procedimentos de Guan (1986) e de Tabatabai & Bremner (1969), respectivamente.

As características avaliadas foram submetidas à análise de variância com aplicação do teste *F*, seguido pelo teste de Tukey para comparações entre médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2003) sendo utilizado $\alpha = 0,05$ como valor de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio, o incremento no desenvolvimento das plantas de milho foi atribuído apenas à adição de fertilizante nitrogenado ao solo, independente da inoculação do híbrido com *A. brasilense*. A dose equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N promoveu maior crescimento de parte aérea configurando em maiores médias de altura (30,01 cm), diâmetro do colmo (14,76 mm) e massa fresca e seca (78,80 g e 7,46 g, respectivamente) (Tabela 1). Por outro lado, na ausência desse nutriente, o sistema radicular apresentou maior crescimento. Isso ocorre uma vez que, em ambientes com limitação de N, as raízes tendem a se desenvolver para explorar um maior volume de solo, na tentativa de suprir a deficiência (Bonifas *et al.*, 2005; Bonifas & Lindquist, 2006).

A maior dose de N aplicada (equivalente a 200 kg ha⁻¹) apresentou resultado semelhante à ausência de adubação nitrogenada, exceto quanto ao crescimento radicular (Tabela 1). É possível que a quantidade do fertilizante nos vasos tenha provocado um efeito salino no solo, o que prejudicou o desenvolvimento das plantas de milho. Segundo Taiz & Zeiger (2006), a alta salinidade próxima às sementes ou raízes pode inibir a absorção de água pelas plantas, devido à diminuição do potencial osmótico e, conseqüentemente, do potencial hídrico.

Apesar de outros trabalhos citarem benefícios da inoculação com *Azospirillum* no desenvolvimento das plantas (Okon & Labandera-González, 1994; Salamone & Döbereiner, 1996), o efeito desta prática não foi observado neste estudo, nem mesmo quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, cujo crescimento é relatado na literatura em decorrência da produção de fitohormônios por essas bactérias (Salamone & Döbereiner, 1996). Segundo esses autores, a inoculação modifica a morfologia do sistema radicular das plantas, aumentando não apenas o número de radículas, mas também, o diâmetro das raízes laterais e adventícias.

Neste ensaio, o acúmulo de massas de matéria fresca e seca do sistema radicular e seu volume não foram afetados pelas doses do inoculante. As médias variaram de 52,25 a 54,80 g e de 1,57 a 1,62 g de massa fresca e seca do sistema radicular, respectivamente, e de 36,27 a 37,78 mL para o volume das raízes. Na verdade, a inconsistência em trabalhos de inoculação com *Azospirillum* é bastante conhecida e variações no ambiente, solo ou substrato, nas plantas e nos componentes da microflora são consideradas como responsáveis por esta variação entre experimentos (Dobbelaere *et al.*, 2001). É importante destacar que o solo utilizado neste trabalho foi anteriormente cultivado com soja, implicando em possíveis efeitos residuais desta cultura. A sucessão milho e soja na agricultura brasileira é uma prática muito comum,

mas pouco é feito para avaliar a resposta das plantas de milho com estas características de ensaio.

Ausência de respostas à inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* também são encontradas na literatura. Verona *et al.* (2010) relatam que não houve diferença significativa para as variáveis altura, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz de plantas de milho inoculadas, na presença ou não de fitorreguladores. Da mesma maneira, a aplicação de diferentes doses de inoculante à base dessa bactéria em sementes de milho não promoveu incrementos na massa fresca do sistema radicular e tampouco no acúmulo de massa seca da parte aérea (Roberto *et al.*, 2010).

Devido à grande exigência por N, o milho é uma cultura altamente responsiva a esse fertilizante, apresentando incrementos em várias características que podem influenciar na produção final, como o teor de clorofila, de N e de fósforo nas plantas (Tabela 2).

Quanto ao teor relativo de clorofila, expresso em ICF (Índice de Clorofila Falker), nota-se, na Tabela 2, que a adição do fertilizante nitrogenado incrementa esta variável, independente da dose. Resultado semelhante foi obtido por Martins *et al.* (2008), que verificaram que o teor de clorofila em genótipos de milho foi sensível à disponibilidade de N no ambiente. A previsibilidade desses resultados justifica-se pelo fundamental papel do N no metabolismo das plantas, participando, diretamente, na biossíntese de proteínas e clorofilas.

Seguindo esse mesmo padrão de comportamento, o teor de nutrientes nas plantas de milho também foi maior devido à adubação nitrogenada. No caso do nitrogênio, seu teor praticamente dobrou em relação ao controle, variando de 28,34 a 58,17 g de N kg⁻¹ de matéria seca (Tabela 2). Isso ocorre uma vez que o teor de N nas plantas é muito influenciado pela adubação nitrogenada (Killorn & Zourarakis, 1992), refletindo a disponibilidade desse nutriente no solo.

Tabela 1: Altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio – Uberlândia-MG, 2011

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Altura de planta (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Volume de raiz (mL)
0	27,73b	12,84b	50,59c	58,71a	5,93b	2,22a	44,17a
100	30,01a	14,76a	78,80a	53,50ab	7,46a	1,49b	36,38b
200	27,75b	13,10b	62,14b	48,91b	6,37b	1,08c	30,80c
CV (%)	3,92	5,61	7,82	15,52	10,17	14,03	13,84
W ²	0,976	0,973	0,972	0,951	0,946	0,980	0,954
F ²	0,752	1,478	0,321	0,540	1,576	1,722	0,475

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

O teor de fósforo (P) nas plantas de milho também aumentou em função do fornecimento de N via adubação (Tabela 2). Esse resultado sugere que a maior ou menor disponibilidade de N pode exercer efeito na assimilação de P. Interações sinérgicas entre esses nutrientes já foram identificadas na cultura do milho (Machado *et al.*, 2004), sendo que, para Büll (1993), é marcante a influência do N na maior absorção de P pelo milho. À semelhança dos dados apresentados nesse experimento, Reis Júnior *et al.* (2008) também verificaram que aumentos na dose de N resultaram em maior acúmulo de N e P nas plantas de milho.

Por outro lado, os teores de clorofila, N e P não foram influenciados pela inoculação das sementes com *A. brasilense*, variando, respectivamente, de 50,58 a 54,25 ICF, 46,32 a 47,96 g de N kg⁻¹ de tecido seco e 6,69 a 7,11 g de P kg⁻¹ de tecido seco.

Conforme discutido anteriormente, as plantas de milho não apresentaram significativo crescimento quanto às doses do inoculante aplicadas. Dessa forma, não foram capazes de acumular maiores teores de nutrientes. Por outro lado, a adubação nitrogenada configurou incrementos no crescimento vegetativo e na assimilação de N e de P. Esses resultados condizem com Mendonça *et al.* (2006) que, trabalhando com a inoculação de milho com uma mistura de bactérias diazotróficas, encontraram que o acúmulo de N na cultura foi decorrente da variabilidade genotípica das plantas quanto à capacidade de extrair N do solo e não devido à contribuição microbiana. Hungria *et al.* (2010) tampouco verificaram diferenças no teor de nutrientes nas folhas de plantas de milho inoculadas com espécies de *Azospirillum*.

Semelhantemente aos resultados observados para as demais características avaliadas, as atividades das enzi-

mas, no solo cultivado com milho, foram influenciadas apenas pela adição de fertilizante nitrogenado. Em comparação ao controle, a maior dose de N aplicada (200 kg ha⁻¹) configurou aumentos nas atividades da urease e da fosfatase ácida de 67 e 9%, respectivamente (Tabela 2).

Pode-se inferir que a maior dose de N estimulou o crescimento microbiano na rizosfera, refletido pelo aumento das atividades das enzimas. Assim, houve maior ciclagem de nutrientes pelos micro-organismos, aumentando a disponibilidade de NH₄⁺ e fósforo inorgânico (Badalucco & Nannipieri, 2007). Compant *et al.* (2010) demonstraram que a disponibilidade de nutrientes afeta significativamente a composição e liberação de exsudatos pelas raízes das plantas, com efeitos diretos sobre a microbiota do solo. Neste contexto, além da comunidade microbiana, estudos relatam que a atividade dos micro-organismos também pode ser modificada pela fertilização (Chu *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007).

Kakhki *et al.* (2008) também observaram aumento na atividade da urease após adubação nitrogenada, corroborando os resultados apresentados neste experimento. Na maior dose de N aplicada (200 kg ha⁻¹), alguns autores já obtiveram aumento de 94% na atividade dessa enzima (Wang *et al.*, 2008).

Com relação à atividade da enzima fosfatase ácida, seu aumento pode ser atribuído não apenas ao maior crescimento microbiano na rizosfera, mas também à maior taxa de produção dessa enzima pela microbiota (Graham & Haynes, 2005). Isso se deve a uma possível acidificação do solo pelo emprego do fertilizante nitrogenado (em virtude da nitrificação do sulfato de amônio e do nitrato de amônio aplicados) que pode ter favorecido a atividade da fosfatase ácida. Assim, de maneira geral, diversos estudos demonstram que a fertilização do solo com nitrogê-

Tabela 2: Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, e atividade das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) no solo cultivado com esta cultura, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio – Uberlândia-MG, 2011

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Clorofila ²	N ³	P ³	Urease	Fosfatase ⁴
0	34,72b	28,34b	5,04b	56,72 b	275,15 ab
100	61,55a	55,52a	7,96a	45,52 b	267,47 b
200	61,78a	58,17a	7,65a	94,84 a	301,24 a
CV (%)	7,82	15,34	10,43	30,50	5,16
⁵ W	0,973	0,907	0,971	0,989	0,952
⁵ F	1,324	2,478	0,570	1,966	1,288

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²médias expressas em ICF (Índice de Clorofila Falker);

³médias expressas em g do nutriente kg⁻¹ de tecido seco (parte aérea + raízes);

⁴dados transformados segundo \sqrt{x} ;

⁵W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

nio aumenta as atividades da urease e da fosfatase ácida (Saiya-Cork *et al.*, 2002; Graham & Haynes, 2005; Allison *et al.*, 2006), com incrementos variando, em média, de 7 a 56% (Saiya-Cork *et al.*, 2002).

Considerando a relação de desenvolvimento entre a parte aérea e o sistema radicular das plantas de milho, observou-se interação significativa entre as doses de N e as doses de inoculante aplicadas (Tabela 3). Nota-se que o aumento na adubação nitrogenada configura maior crescimento de parte aérea, com destaque para a dose de 200 kg ha⁻¹ de N, principalmente quando associada à maior dose de *A. brasilense* (equivalente a 200 mL ha⁻¹). Nessa condição, as plantas de milho são capazes de desenvolver 7,01 g de parte aérea por unidade de raiz formada, refletindo maior eficiência na utilização dos recursos disponíveis para seu crescimento. Relação inversa, no entanto, ocorre na ausência de N, independente da inoculação das plantas.

Os resultados apresentados sugerem que, em condições limitadas de suprimento de N, as plantas fracionam maior proporção de seu crescimento para formação de sistema radicular, conforme reportado na literatura (Bonifas *et al.*, 2005). O investimento em raízes, entretanto, ocorre em detrimento à formação de parte aérea (Bonifas & Lindquist, 2006). No caso do milho, o comprometimento da área foliar não é desejável, pois pode resultar em baixas produtividades.

O efeito da dose do inoculante (200 mL ha⁻¹ associado à dose de 200 kg ha⁻¹ de N) sugere que, em solos com alta disponibilidade de N, *A. brasilense* pode melhorar a assimilação de nutrientes pelas plantas de milho, direcionando-os para formação de parte aérea. Essa justificativa é consistente com o reportado por Stancheva *et al.* (1992), que afirmam que o aumento da taxa de acúmulo de matéria seca em plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* ocorre, principalmente, na presença de elevadas doses de N, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação desse nutriente. Possivelmente, a maior taxa de absorção está relacionada a modificações na morfologia do sistema radicular, as quais podem estar relacionadas à produ-

ção de fitormônios pela bactéria, conforme abordado em outros estudos (Dobbelaere *et al.*, 2001; Roesch *et al.*, 2007).

No segundo ensaio, o desenvolvimento das plantas de milho, após nova semeadura, foi atribuído apenas ao residual do fertilizante nitrogenado no solo, demonstrando que não houve nenhuma contribuição residual do inoculante utilizado. Na verdade, já se esperava esse resultado uma vez que, de maneira geral, a inoculação com *A. brasilense* não interferiu no desenvolvimento das plantas de milho no ensaio anterior.

Nos tratamentos com a prévia aplicação das doses de 100 e 200 kg ha⁻¹ de N, houve incremento em todos os atributos vegetativos analisados, enquanto na ausência do fertilizante, notou-se menor desenvolvimento vegetativo das plantas (Tabela 4). Este comportamento demonstra a importância do N para as culturas, uma vez que é um macronutriente essencial. Além de ser constituinte dos aminoácidos livres e proteicos, o N está presente em outros compostos importantes, como as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) e os ácidos nucleicos (DNA e RNA), fundamentais à divisão celular e, portanto, à formação e ao crescimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas (Mengel & Kirkby, 2001).

Com relação aos teores de clorofila e de N das plantas de milho, observou-se comportamento semelhante ao descrito no ensaio anterior. Maiores médias foram obtidas com o residual da adubação nitrogenada, até 60,56 ICF e 57,62 g de N kg⁻¹ de matéria seca (Tabela 5). Por outro lado, não houve diferença significativa quanto às doses de inoculante aplicadas. Nesse caso, o teor de clorofila variou de 42,42 a 46,85 ICF e o teor de nitrogênio de 41,17 a 41,65 g kg⁻¹. O teor de P não foi influenciado pelo residual dos tratamentos.

As atividades das enzimas urease e fosfatase, no solo, não foram influenciadas pelos residuais da adubação nitrogenada e tampouco da inoculação. Isto sugere que houve um declínio na população de micro-organismos associados à rizosfera e, portanto, na atividade dessas enzimas, possivelmente devido à utilização dos nutrientes pelas plantas de milho.

Tabela 3: Relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz de plantas de milho em função de doses de nitrogênio e da inoculação com *A. brasilense* – Uberlândia-MG, 2011

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Dose de <i>A. brasilense</i> (mL ha ⁻¹)		
	0	100	200
0	2,65A b	2,93A b	2,65A c
100	5,25A a	5,11A a	5,23A b
200	5,87B a	5,48B a	7,01A a
CV (%) = 13,81	² W = 0,988	² F = 1,720	

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Tabela 4: Altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio – Uberlândia-MG, 2011

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Altura de planta ² (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	MFPA ² (g)	MFR ² (g)	MSPA ³ (g)	MSR (g)	Volume de raiz (mL)
0	10,83b	5,92b	5,24b	11,14b	0,57b	0,40c	8,45b
100	22,77a	10,20a	25,16a	14,87a	2,52a	0,75a	14,28a
200	20,69a	9,84a	23,72a	13,38ab	2,52a	0,60b	12,46a
CV (%)	9,19	9,78	12,41	10,52	8,00	21,12	26,07
⁴ W	0,963	0,959	0,940	0,962	0,937	0,959	0,963
⁴ F	1,604	4,162	1,140	0,793	2,920	1,048	2,101

¹ médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

² dados transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$;

³ dados transformados segundo $\sqrt{x+1}$.

⁴ W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Tabela 5: Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio – Uberlândia-MG, 2011

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Clorofila ^{2,3}	N ⁴	P ^{4,5}
0	22,04c	21,15c	6,66a
100	53,09b	45,30b	5,61a
200	60,56a	57,62a	6,01a
CV (%)	6,91	13,18	9,28
⁶ W	0,868	0,974	0,955
⁶ F	2,567	0,779	2,509

¹ médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

² médias expressas em ICF (Índice de Clorofila Falker);

³ dados transformados segundo \sqrt{x} ;

⁴ médias expressas em g do nutriente kg⁻¹ de tecido seco (parte aérea + raízes);

⁵ dados transformados segundo $\sqrt{x+1}$;

⁶ W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

CONCLUSÕES

A adição de fertilizantes nitrogenados promoveu maior desenvolvimento das plantas de milho, elevou os teores de clorofila e de nutrientes. Houve aumento da atividade das enzimas relacionadas à disponibilização de amônio e fósforo inorgânico na rizosfera. Além disso, o nitrogênio apresentou efeito residual no desenvolvimento das plantas na semeadura subsequente. A dose de 200 mL ha⁻¹ de *A. brasilense* associada à dose de 200 kg ha⁻¹ de N aumentou a resposta fisiológica da cultura.

REFERÊNCIAS

- Allison SD, Nielsen C & Hughes RF (2006) Elevated enzyme activities in soils under the invasive nitrogen-fixing tree *Falcataria moluccana*. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1537-1544.
- Awika JM (2011) Major cereal grains production and use around the world. In: Awika JM, Piironen V & Bean S (Eds.) *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion*. Washington, American Chemical Society. p.01-13.
- Badalucco L & Nannipieri P (2007) Nutrient transformations in the rhizosphere. In: Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P (Eds.) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. 2ª ed. Boca Raton, CRC Press. p.111-133.
- Bonifas KD & Lindquist JL (2006) Predicting biomass partitioning to root versus shoot in corn and velvetleaf. *Weed Science*, 54:133-137.
- Bonifas KD, Walters DT, Cassman KG & Lindquist JL (2005) The effects of nitrogen supply on root:shoot ratio in corn and velvetleaf. *Weed Science*, 53:670-675.
- Büll LT (1993) Nutrição mineral do milho. In: Büll LT & Cantarella H (Eds.) *Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, Potafós. p.63-145.
- Cantarella H & Duarte AP (2004) Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: Galvão JCC & Miranda GV (Eds.) *Tecnologias de produção do milho*. Viçosa, UFV. p.139-182.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V & Luna V (2011) Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. In: Maheshwari DK (Ed.) *Bacteria in Agrobiology: plant nutrient management*. Berlin, Springer. p.141-182.
- Chela GS, Tiwana MS, Thind IS, Puri KP & Kaur K (1993) Effect of bacterial cultures and nitrogen fertility on the yield and quality of maize fodder (*Zea mays* L.). *Annals of Biology*, 9:83-86.

- Chu H, Lin X, Fujii T, Morimoto S, Yagi K, Hu J & Zhang J (2007) Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:2971-2976.
- Compant S, Clément C & Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:669-678.
- Conceição PM, Vieira HD, Canellas LP, Olivares FL & Conceição OS (2009) Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural*, 39:1880-1883.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S & Okon Y (2001) Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:871-879.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J & Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Critical Review in Plant Science*, 22:107-149.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2ª ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. 627p.
- Ferreira DF (2003) Programa Sisvar.exe. Sistema de Análises de Variância. Versão 5.3. CD-ROM.
- Graham MH & Haynes RJ (2005) Organic matter accumulation and fertilizer-induced acidification interact to affect soil microbial and enzyme activity on a long-term sugarcane management experiment. *Biology and Fertility of Soils*, 41:249-256.
- Guan SY (1986) Soil enzymes and their research methods. Beijing, Agricultural Publishing House. 136p.
- He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG & Di HJ (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 9:2364-2374.
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM & Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331:413-425.
- Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina, Embrapa Soja. 36p.
- Kakhki FV, Haghnia G & Lakzian A (2008) Effect of enriched sewage sludge on soil urease activity. *Soil and Environment*, 27:143-147.
- Killorn R & Zourarakis D (1992) Nitrogen fertilizer management effects on corn grain yield and nitrogen uptake. *Journal of Production Agriculture*, 5:142-148.
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A & Vanderleyden J (2000) Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 8:298-300.
- Machado CTT, Machado AT, Reis Júnior FB & Vilela AL (2004) Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes em milho submetido a dois níveis de adubação nitrogenada. In: 26ª Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; 10ª Reunião Brasileira sobre Micorrizas; 7º Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo; 5ª Reunião Brasileira de Biologia do Solo: Avaliação das Conquistas: Base para Estratégias Futuras, Viçosa. Anais, SBSC/UEDESC. CD-ROM.
- Martins AO, Campostrini E, Magalhães PC, Guimarães LJM, Durães FOM, Marriel IE & Torres Netto A (2008) Nitrogen-use efficiency of maize genotypes in contrasting environments. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8:291-298.
- Mendonça MM, Urquiaga S & Reis VM (2006) Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:1681-1685.
- Mengel K & Kirkby EA (2001) Principles of plant nutrition. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 849p.
- Okon Y & Labandera-González C (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1591-1601.
- Reis Júnior FB, Machado CTT, Machado AT & Sodek L (2008) Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1139-1146.
- Roberto VMO, Silva CD & Lobato PN (2010) Resposta da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In: 28º Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia. Anais, Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.2429-2434.
- Roesch LFW, Quadros PDQ, Camargo FOC & Triplett EW (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1377-1383.
- Saiya-Cork KR, Sinsabaugh RL & Zak DR (2002) The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1309-1315.
- Salamone IEG & Döbereiner J (1996) Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, 21:193-196.
- Santos HG, Almeida JA, Oliveira JB, Lumbreras JF, Anjos LHC, Coelho MR, Jacomine PKT, Cunha TJF & Oliveira VA (2013) Sistema brasileiro de classificação de solos. 3ª ed. Brasília, Embrapa. 353p.
- Souza JA (2006) Manejo da fertilidade de solo para a cultura do milho. *Informe Agropecuário*, 27:26-37.
- Stancheva I, Dimitrov I, Kaloyanova N, Dimitrova A & Angelov M (1992) Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. *Agronomie*, 12:319-324.
- Tabatabai MA & Bremner JM (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1:301-307.
- Taiz L & Zeiger E (2006) Plant Physiology. 4ª ed. Redwood City, Cummings. 608p.
- USDA - United States Department of Agriculture (2015) Coarse Grains: World Markets and Trade. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf>>. Acessado em: 14 de agosto de 2015.
- Verma SC, Ladha JK & Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91:127-141.
- Verona DA, Duarte Júnior JB, Rossol CD, Zoz T & Costa ACT (2010) Tratamento de sementes de milho com Zeavit®, Stimulate® e inoculação com *Azospirillum* sp. In: 28º Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia. Anais, Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.3731-3737.
- Wang QK, Wang SL & Liu YX (2008) Responses to N and P fertilization in a young *Eucalyptus dunnii* plantation: microbial properties, enzyme activities and dissolved organic matter. *Applied Soil Ecology*, 40:484-490.