

OSMAR ROBERTO DALLA SANTA

**INOCULANTE A BASE DE AZOSPIRILLUM APPLICADO NAS
CULTURAS DE TRIGO, CEVADA, AVEIA E MILHO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Tecnologia Química, do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2000

OSMAR ROBERTO DALLA SANTA

**INOCULANTE A BASE DE AZOSPIRILLUM APLICADO NAS
CULTURAS DE TRIGO, CEVADA, AVEIA E MILHO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química - com concentração em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR

Profª. MARIANGELA HUNGRIA DA CUNHA
EMBRAPA/CNP-SOJA – Londrina-PR

Prof. PEDRO RONZELLI JR.
Setor de Ciências Agrárias, UFPR

Curitiba, 05 de Maio de 2000

Aos meus pais Francisco e Cecília,
pela minha educação.

À minha esposa Herta, pelo apoio e
carinho desprendidos no decorrer
deste trabalho.

À minha filha Bruna Lais, pela
compreensão da minha ausência
durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Ricardo Soccol, pela amizade, orientação e estímulo no desempenho profissional.

Ao Professor Pedro Ronzelli Júnior, pela co-orientação e amizade durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Professor Henrique Soares Koehler, pela co-orientação na parte estatística deste trabalho.

À coordenação, professores e funcionários do curso de mestrado em Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Aplicada, pelo apoio e auxílios prestados.

Ao setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, pelas facilidades na execução do trabalho experimental de campo e aos funcionários da Estação Experimental do Canguiri da UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À Empresa NITRAL / URBANA, pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos.

À Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária – FAPA, que possibilitou a implantação de ensaios a campo. Aos funcionários que auxiliaram na realização dos experimentos.

Ao pesquisador da FAPA, Engº. Agrº. Itacir Elio Sandini, pelo apoio técnico e amizade.

À Georgina Michelena e Ramona Fernández, pesquisadoras do Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, pela rica convivência e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos e do curso de mestrado em Tecnologia Química, pela amizade e constante apoio.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Nitrogênio na agricultura.....	4
2.2. Fixação biológica de nitrogênio.....	5
2.3. Bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>	6
2.4. Promoção do crescimento das plantas por <i>Azospirillum</i>	8
2.4.1. Fixação biológica de nitrogênio.....	8
2.4.2. Produção de fitormônios.....	9
2.4.3. Capacidade de redução do nitrato e excreção de NH ₄	10
2.5. Efeitos da inoculação.....	10
2.6. Colonização das raízes.....	11
2.7. Experimentos de inoculação.....	12
2.7.1. Inoculação em trigo.....	12
2.7.2. Inoculação em cevada.....	15

2.7.3. Inoculação em aveia.....	15
2.7.4. Inoculação em milho.....	16
2.7.5. Coinoculação.....	18
2.8. Fatores que causam a inconsistência dos resultados.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Produção de inoculante.....	20
3.2. Ensaios agronômicos.....	21
3.2.1. Localização dos experimentos.....	21
3.2.2. Solo.....	22
3.2.3. Adubação recomendada para cada cultura.....	23
3.2.4. Tratamentos.....	24
3.2.5. Inoculação.....	24
3.2.6. Área experimental.....	25
3.2.7. Delineamento experimental.....	26
3.2.8. Preparo do solo.....	26
3.2.9. Semeadura e condução.....	26
3.2.10. Variáveis avaliadas.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Estabilidade do inoculante turfa em pó.....	29
4.2. Inoculação em trigo.....	30
4.3. Inoculação em cevada.....	33
4.4. Inoculação em aveia.....	36
4.5. Inoculação em milho.....	38
4.5.1. Inoculação em milho com <i>Azospirillum RAM-7</i>	38

4.5.2. Inoculação em milho com <i>Azospirillum</i> RAM-5.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. SUGESTÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Adubação utilizada nos experimentos de trigo, cevada, aveia e milho.....	23
TABELA 2. Tratamentos utilizados nos experimentos de trigo, cevada, aveia e milho.....	24
TABELA 3. Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos de trigo, cultivar OR-1 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	31
TABELA 4. Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos de cevada, cultivar cervejeira BR-2 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	33
TABELA 5. Classificação comercial da cevada, cultivar cervejeira BR-2 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	36
TABELA 6. Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos de aveia, cultivar FAPA-1 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	37
TABELA 7. Produtividade, lipídios totais e teor de nitrogênio total dos grãos de milho, cultivar híbrido Cargill-909 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	39
TABELA 8. Produtividade, lipídios totais e teor de nitrogênio total dos grãos de milho, cultivar híbrido Cargill-909 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-5.....	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Fermentador MDL Marubishi utilizado na produção de biomassa, Laboratório de Processos biotecnológicos, UFPR.....	20
FIGURA 2.	Área utilizada para a implantação dos experimentos de trigo, cevada e aveia, Estação Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99.....	22
FIGURA 3.	Detalhes da unidade experimental para as culturas de trigo, cevada e aveia, Estação Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99.....	25
FIGURA 4.	Estabilidade do inoculante <i>Azospirillum</i> RAM-7 na formulação turfa em pó armazenado em diferentes temperaturas, Laboratório de Processos Biotecnológicos, UFPR.....	29
FIGURA 5.	Detalhes das diferenças visuais entre os tratamentos no ensaio de trigo, cultivar OR-1 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7, Estação Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99.....	30
FIGURA 6.	Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de trigo, cultivar OR-1, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	32
FIGURA 7.	Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de cevada, cultivar cervejeira BR-2, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	35
FIGURA 8.	Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de aveia, cultivar FAPA-1, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	38

FIGURA 9. Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	40
FIGURA 10 Efeito dos tratamentos sobre o peso de mil sementes, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	41
FIGURA 11. Efeito dos tratamentos na ocorrência de grãos ardidos, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-7.....	41
FIGURA 12. Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909 inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-5.....	44
FIGURA 13. Efeito dos tratamentos sobre o peso de mil sementes, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-5.....	45
FIGURA 14. Efeito dos tratamentos na ocorrência de grãos ardidos, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909, inoculado com <i>Azospirillum</i> RAM-5.....	45

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a estabilidade de armazenamento do inoculante *Azospirillum* RAM-7 na formulação turfa em pó em quatro temperaturas diferentes, e avaliar os efeitos da inoculação nas culturas de trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), aveia (*Avena sativa*) e milho (*Zea mays*), sobre a produtividade e qualidades tecnológicas dos grãos. Os experimentos foram realizados em condições de campo utilizando o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 4 repetições. Os tratamentos são oriundos da inoculação, associada ou não com diferentes níveis de nitrogênio (N) mineral. O N foi aplicado na semeadura e em cobertura e, a adubação base com fósforo e potássio foi igual em todos os tratamentos, nas doses respectivas de cada cultura. A inoculação foi feita pelo método de contaminação das sementes na concentração de 10^6 UFC.g⁻¹ de semente. A melhor estabilidade do inoculante turfa em pó ocorreu na temperatura de 4° C, mantendo 10⁸ UFC.g⁻¹ de suporte após 120 dias de armazenagem. No cultivar de trigo OR-1 a inoculação aumentou significativamente ($p<0,05$) o rendimento, em 23,9% em relação a testemunha não inoculada. No cultivar de cevada cervejeira BR-2, a produtividade e o teor de nitrogênio total dos grãos foram influenciados ($p<0,05$) pela inoculação. A inoculação no cultivar de aveia FAPA-1 teve influência significativa ($p<0,05$) na produtividade, quando associada a 32 kg.ha⁻¹ de N. Para o cultivar de milho híbrido Cargill 909 a inoculação com *Azospirillum* RAM-7, associada a 150 kg.ha⁻¹ aumentou o rendimento, o teor de N total e de lipídios totais dos grãos ($p<0,05$). A inoculação com *Azospirillum* RAM-5 no mesmo cultivar de milho não teve influência significativa ($p<0,05$) nas variáveis avaliadas. A inoculação proporcionou melhor utilização do N mineral, aumentando a quantidade de grãos produzidos para cada kg de N aplicado em todas as quatro culturas.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the storage stability of the inoculant *Azospirillum* RAM-7 in the powder seat formulation in four different temperatures, and to evaluate the effects of inoculation in wheat (*Triticum aestivum*), barley (*Hordeum vulgare*), oats (*Avena sativa*) and corn (*Zea mays*) crops concerning to yield and grain technological quality. The experiments were carried out under field conditions, in a complete randomized block experimental design with four replicates per treatment. The treatments were originated by the inoculation associated or not with different levels of mineral nitrogen (N). N was applied sowing and as cover fertilizer; the phosphorous and potassium similare for all treatments as recommended for each crop. The inoculation was carried out by the seed coating method at the 10^6 CFU.g⁻¹ concentration. The best inoculant stability in the seat powder occurred at the temperature of 4° C, maintaining 10^8 CFU.g⁻¹ of seat after a 120 day storage. In the OR-1 wheat variety the inoculation significantly ($p<0,05$) increased yield in 23,9%, over the control. In the barley BR-2 variety, yield and seed total N content were affected ($p<0,05$) by inoculation. The inoculation of the oats variety FAPA-1 significantly affected ($p<0,05$) yield, when associated with 32 kg.ha⁻¹of nitrogen. For the hybrid corn variety Cargill-909 the inoculation with the *Azospirillum* RAM-7 associated with 150 Kg N.ha⁻¹ increased yield, and total N and total lipids seed content ($p<0,05$). The inoculation with *Azospirillum* RAM-5 at the same corn variety did not affect significantly any of the parameters($p<0,05$). For all four culture, inoculation provided better mineral N utilization, increasing the seed amount produced per kg of applied N.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescente interesse em se fazer uma agricultura mais econômica e ecológica, muitos estudos utilizando a aplicação de técnicas biotecnológicas buscam novas alternativas para a produção de alimentos. A utilização de rizobactérias que promovem o crescimento das plantas pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, ou devido a capacidade de produzirem substâncias promotoras de crescimento das plantas, busca substituir a fertilização de nitrogênio mineral em não leguminosas (fabáceas).

A qualidade do solo é um dos pontos chave para o sucesso de uma agricultura sustentável, a qual está relacionada com os componentes físicos, químicos, biológicos e suas interações (KENNEDY & SMITH, 1995). Do ponto de vista agronômico, solo fértil é aquele que apresenta, em formas acessíveis para as plantas, todos os nutrientes necessários ao seu crescimento, ou uma população de microrganismos capaz de liberá-los para as plantas. Destacam-se os microrganismos que atuam como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem dos elementos, atuando como fonte e dreno dos nutrientes (HUNGRIA *et al.*, 1997; KENNEDY & SMITH, 1995).

A importância dos microrganismos na disponibilidade dos nutrientes é exemplificada pelos resultados obtidos em avaliação realizada num campo nativo no Rio Grande do Sul, onde a quantidade de nutrientes imobilizados por microrganismos foi calculada em 147 kg.ha^{-1} de nitrogênio (N), 114 kg.ha^{-1} de fósforo (P), 96 kg.ha^{-1} de potássio (K) e 14 kg.ha^{-1} de cálcio (Ca), num período de 12 meses (CATTELAN & VIDOR, 1990). Portanto a microbiota do solo constitui um importante reservatório de nutrientes, os quais são liberados gradualmente para as plantas, sem perdas por lixiviação (HUNGRIA *et al.*, 1997).

O conhecimento sobre a fixação biológica de nitrogênio em não leguminosas, principalmente em gramíneas (poáceas), entre elas diversos cereais, tornou-se um dos maiores desafios, já que estes representam a base alimentar mais importante da população, principalmente de países em desenvolvimento (DÖBEREINER, 1992). Atualmente, a fixação biológica de nitrogênio contribui com aproximadamente 35% da dieta humana de proteína necessária para todo o mundo (VANCE, 1999).

A necessidade individual de nitrogênio dos seis bilhões de habitantes da terra é, em média, de 11 g.dia⁻¹, o equivalente a 70 g de proteína ou, aproximadamente, 24 milhões de toneladas de nitrogênio por ano (VANCE, 1999). A grande importância do nitrogênio reside no fato de que é constituinte essencial das proteínas, ácidos nucléicos e outros compostos de bases nitrogenadas, portanto, essencial aos processos vitais de todos os seres vivos (GYURJÁN *et al.*, 1995; PAYNE *et al.*, 1981).

As bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azobacter* e *Acetobacter* apresentam ocorrência generalizada em culturas economicamente importantes como milho trigo, arroz, sorgo e cana-de-açúcar, estão sendo empregadas, com freqüência, em experimentos visando a utilização agronômica como biofertilizantes (DÖBEREINER, 1997; REINHOLD & HUREK, 1988; SUNDARAM *et al.*, 1988).

As bactérias do gênero *Azospirillum* apresentam potencial de aplicação em sistemas agrícolas. A inoculação de plantas com *Azospirillum* pode trazer efeitos benéficos sobre a morfologia e a fisiologia do vegetal (FALLIK *et al.*, 1994). Em torno de 70% dos experimentos realizados a campo mostraram resultados de aumentos de até 30% na produtividade (BASHAN & HOLGUIN, 1997; MACHADO *et al.*, 1998).

Pela importância da redução dos custos com fertilização nitrogenada mineral para a produção de alimentos e pelos resultados positivos encontrados na literatura sobre a produtividade devido a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*, em diversos cereais e outras gramíneas, foram conduzidos experimentos a campo, com o objetivo de verificar o efeito da aplicação isolada de inoculante, ou associada com vários níveis de fertilização nitrogenada mineral, sobre o rendimento e qualidades tecnológicas de cultivares de milho,

trigo, cevada e aveia, testando a hipótese da substituição parcial ou total da adubação nitrogenada mineral, pelo uso de inoculante a base de *Azospirillum*. Também foi realizado estudo da estabilidade do inoculante *Azospirillum* na formulação turfa em pó por 150 dias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NITROGÊNIO NA AGRICULTURA

Na agricultura atual o nitrogênio é um nutriente limitante para o crescimento e consequente produtividade das culturas. Este elemento é encontrado na forma gasosa (N_2) constituindo, aproximadamente, 78% dos gases que formam o ar atmosférico, mas as plantas não conseguem utilizá-lo nesta forma (DÖBEREINER, 1997; GYURJÁN *et al.*, 1995; HUNGRIA *et al.*, 1997).

As plantas obtêm o nitrogênio, principalmente, pela aplicação de fertilizantes nitrogenados sintetizados industrialmente a partir do dinitrogênio (N_2) atmosférico, utilizando altas pressões e temperaturas para quebrar a tripla ligação entre os dois átomos de nitrogênio, a um custo de seis barris de petróleo para cada tonelada de amônia (NH_3) produzida. O nitrogênio também se torna disponível para as plantas pela fixação biológica, onde algumas bactérias chamadas diazotróficas possuem um aparato enzimático capaz de quebrar a tripla ligação entre os dois átomos de nitrogênio atmosférico, formando a mesma amônia produzida industrialmente, mas sem o gasto de fontes energéticas não renováveis (DÖBEREINER, 1997; DÖBEREINER & BALDANI, 1998; GYURJÁN *et al.*, 1995; HUNGRIA *et al.*, 1997; OKON & VANDERLEYDEN, 1998; VICTORIA *et al.*, 1992).

O nitrogênio, por ser um dos elementos essenciais, é absorvido em grandes quantidades pelas plantas, necessitando estar disponível em alta concentração no solo (PÖTKER, 2000). Para a cultura do milho em Entre Rios, PR, na safra 1999/2000, a média de nitrogênio utilizada foi 148 kg.ha^{-1} , alcançando elevados

índices de produtividade, tendo ultrapassado 8.400 kg.ha⁻¹, enquanto a média nacional é em torno de 2.780 kg.ha⁻¹ (SANDINI, 2000).

As quantidades de nitrogênio utilizadas para as culturas variam de acordo com o teor de matéria orgânica do solo, a cultura anterior e o cultivar utilizado. Em média são recomendados 140 kg.ha⁻¹ de nitrogênio para a cultura do milho (Recomendações técnicas para a cultura de milho no Estado do Rio Grande do Sul, 1999), 50 kg.ha⁻¹ de nitrogênio para a cultura do trigo (Reunião da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo, 1999), 60 kg.ha⁻¹ de nitrogênio para a cultura da cevada (Reunião anual de pesquisa de cevada, 1997) e 40 kg.ha⁻¹ de nitrogênio para a cultura de aveia (Comissão sul brasileira de pesquisa de aveia, 1995).

2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGIA DE NITROGÊNIO (FBN)

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio (N₂) atmosférico em amônia (NH₃), catalizado pelo complexo enzimático da nitrogenase, que é constituída pelas proteína-Fe e proteína-MoFe. A estequiometria da reação é a seguinte (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; HARTMANN & ZIMMER, 1994; MACHADO *et al.*, 1998):



Para que a enzima nitrogenase catalise a reação de redução do N₂ atmosférico em NH₃ são necessárias baixas tensões de oxigênio (O₂); também a presença de íons de amônia, além de certo nível, pode inibir a ação catalítica da nitrogenase (ARSÈNE *et al.*, 1994; BASHAN & LEVANONY, 1990; DÖBEREINER, 1997; HARTMANN & ZIMMER, 1994; JOFRÉ *et al.*, 1998a; MACHADO *et al.*, 1998; MICHELS *et al.*, 1994; PEDROSA *et al.*, 1981; STEPHAN *et al.*, 1981; SUMNER, 1990; TARRAND *et al.*, 1978).

2.3. BACTÉRIAS DO GÊNERO AZOSPIRILLUM

As primeiras bactérias de vida livre fixadoras de N₂ foram isoladas por Beijerinck em 1925 e denominadas de *Spirillum lipoferum* originalmente. Em 1976 a equipe da pesquisadora J. Döbereiner encontrou estas bactérias distribuídas na rizosfera de inúmeras gramíneas tropicais. O gênero *Azospirillum* foi proposto por TARRAND *et al.* (1978), com a descrição das características das espécies *A. brasiliense* e *A. lipoferum* (BASHAN & LEVANONY, 1990; DÖBEREINER, 1995; PEDROSA *et al.*, 1981; TARRAND *et al.*, 1978).

As bactérias *Azospirillum* pertencem a subclasse alfa das protobactérias. São diazotróficas, ou seja, são capazes de utilizar o N₂ como única fonte de nitrogênio para o seu crescimento, também são aeróbicas, quimiorganotróficas, oxidase positivas, gram-negativas, pleomórficas e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 30 e 42° C (ALEXANDRE *et al.*, 1999; BASHAN & HOLGUIN, 1997; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER *et al.*, 1995; FANI *et al.*, 1995; GILLIS & REINHOLD-HUREK, 1994; MACHADO *et al.*, 1998; OLUBAYI *et al.*, 1998; PEREG-GERK *et al.*, 1998; TARRAND *et al.*, 1978; ZAMAROCZY, 1995).

Atualmente o gênero *Azospirillum* é constituído por cinco espécies: *A. brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* e *A. iraqense* às quais deve ser acrescida *A. conglomonans* que está sendo proposta como mais uma espécie (BALLY *et al.*, 1995; BASHAN & HOLGUIN, 1997; DÖBEREINER *et al.*, 1995; DUNG *et al.*, 1995; FANI *et al.*, 1995; GILLIS & REINHOLD-HUREK, 1994; MACHADO *et al.*, 1998).

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm ocorrência ampla, sendo encontradas no círculo polar ártico, em climas temperados e em maior número em climas tropicais, formando diferentes tipos de associações com inúmeras espécies vegetais, incluindo culturas economicamente importantes cultivadas extensivamente, como trigo, milho, arroz, sorgo e cana-de-açúcar (BASHAN & HOLGUIN, 1997; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992;

FANI *et al.*, 1995; JOFRÉ, *et al.*, 1998b; KATUPITIYA *et al.*, 1995; VLASSAK & REYNNDERS, 1981).

Na associação planta-bactéria, quando essas plantas são não leguminosas, não ocorre a formação de estruturas específicas, como os nódulos da fixação simbiótica comuns nas leguminosas infectadas por bactérias do gênero *Rhizobium* que realizam o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), sendo então denominada de fixação assimbiótica ou associativa. A falta de estruturas específicas para realizar o processo da FBN torna a fixação associativa de nitrogênio mais suscetível aos fatores ambientais (DÖBEREINER 1997; HUNGRIA *et al.*, 1997).

Inicialmente, acreditava-se que havia bactérias do gênero *Azospirillum* somente na rizosfera, mas posteriormente, foram isoladas do solo e, também certas estirpes endófitas, que são capazes de colonizar internamente a planta, fornecendo assim nitrogênio com mais eficiência (ASSMUS, *et al.*, 1995; BASHAN & LEVANONY, 1990; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER *et al.*, 1995; DÖBEREINER, 1992; HECHT-BUCHHOLZ, 1998; MACHADO *et al.*, 1998; KIRCHHOF *et al.* 1997; PAYNE *et al.*, 1981; REINHOLD & HUREK, 1988).

Uma importante característica das bactérias *Azospirillum* é a sua versatilidade nutricional, pois são capazes de utilizar, como fontes nutritivas, uma grande variedade de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos encontrados na rizosfera de plantas e de fontes microbianas (BASHAN & LEVANONY, 1990; HARTMANN & ZIMMER, 1994; OLUBAYI *et al.*, 1998). Sua atividade metabólica varia com as mudanças na composição nutricional do meio e com os estágios de desenvolvimento das células (OLUBAYI *et al.*, 1998).

2.4. PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS POR AZOSPIRILLUM

2.4.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio foi o primeiro mecanismo responsabilizado por melhor crescimento e rendimento e pelo aumento na incorporação de nitrogênio total em plantas inoculadas com *Azospirillum* (BASHAN & LEVANONY, 1990). Contudo, estudos mais detalhados para quantificar o nitrogênio fixado utilizando $^{15}\text{N}_2$ ou método de diluição isotópica ^{15}N e balanços de nitrogênio total do sistema em plantas (BODDEY & DÖBEREINER, 1994; BODDEY, 1986; BODDEY *et al.*, 1986; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992; KUCEY, 1988) mostram que a contribuição da FBN é mínima, somente 5%, aproximadamente, do nitrogênio fixado é incorporado pelas plantas (BODDEY *et al.*, 1986; OKON & VANDERLEYDEN, 1998), sendo responsável por 5 a 18% do aumento total do crescimento da planta (BASHAN & HOLGUIN, 1997; CHRISTIANSEN-WENIGER & VAN VEEN, 1991; MACHADO *et al.*, 1998).

A atividade da nitrogenase na rizosfera de várias gramíneas associadas com *Azospirillum* spp., muitas vezes, sugere considerável potencial para a fixação de N_2 , mas a atividade da nitrogenase é muito variável em razão da falta de mecanismos de proteção contra o oxigênio (VOLPON *et al.*, 1981).

A habilidade em relação a atividade de redução de acetileno (ARA), em estírpes de *Azospirillum* isoladas, em climas temperado e tropical foram comparadas em temperaturas variando entre 5 e 40° C. As bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas em solo de clima temperado tiveram melhor atividade de redução de acetileno em baixas temperaturas que as estírpes de regiões tropicais, portanto, as bactérias que estão adaptadas as suas condições de desenvolvimento fixam maiores quantidades de nitrogênio (JAIN *et al.*, 1987).

2.4.2 PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS

A presença do *Azospirillum* na rizosfera das plantas pode causar modificações fisiológicas, como alterações da permeabilidade para certos íons (KUCEY, 1998) e morfológicas nas raízes, como o aumento da densidade e comprimento dos pêlos absorventes, rapidez no aparecimento das raízes laterais e aumento do volume e da superfície radicular (ARSÈNE *et al.*, 1994; BARBIERI *et al.*, 1995; BASHAN & LEVANONY, 1990; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; FALLIK *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1983; MACHADO *et al.*, 1998; OKON & KAPULNIK, 1986; OKON & VANDERLEYDEN, 1998).

Estas modificações têm sido atribuídas à capacidade que estas bactérias têm para produzir substâncias promotoras do crescimento das plantas. São produzidos fitormônios como giberelinas, auxinas, citocininas e etileno (BAR & OKON, 1995; BASHAN & HOLGUIN, 1997; BODDEY *et al.*, 1986; BODDEY & DÖBEREINER, 1998; BROEK *et al.*, 1993; DEL GALLO & FRENDRIK, 1994; FAGES, 1994; HARTMANN & ZIMMER, 1994; HUBBELL *et al.*, 1981; IOSIPENKO & IGNATOV, 1995; KATZI *et al.*, 1995; KUCEY, 1988; LIN *et al.*, 1983; MACHADO *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 1998; SUMNER, 1990; VANDERLEYDEN *et al.*, 1995; ZIMMER *et al.*, 1995).

Os efeitos benéficos, nas plantas, pela inoculação com *Azospirillum* não são somente devido a FBN na rizosfera mas, principalmente, pela melhor eficiência na absorção de água e nutrientes, que ocorre devido a um sistema radicular mais desenvolvido, aumentando a área de solo explorada pelas raízes (BAR & OKON, 1995; BASHAN & LEVANONY, 1990; FALLIK & OKON, 1996; HUBBELL *et al.*, 1981; IGNATOV *et al.*, 1995; IOSIPENKO & IGNATOV, 1995; JOFRÉ *et al.*, 1998b; KUCEY, 1988; LIN *et al.*, 1983; OKON & KAPULNIK, 1986; SUNDARAM *et al.*, 1988; VANDERLEYDEN *et al.*, 1995).

2.4.3 CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO NITRATO E EXCREÇÃO DE NH₄⁺

A maior parte das bactérias *Azospirillum* encontradas em associação com as raízes de gramíneas e cereais são predominantemente nitrato redutase negativas (NR⁻) (BODDEY & DÖBEREINER, 1988). As respostas no crescimento de plantas inoculadas são superiores quando se utiliza estirpes nitrato redutase positivas (NR⁺) em relação às nitrato redutase negativas (NR⁻), devido a melhor assimilação de nitrato (NO₃⁻), pelas raízes, aumentando o teor de nitrogênio total das plantas e o rendimento de grãos (FERREIRA et al., 1987; FREITAS et al., 1981; SUMNER, 1990; VOLPIN & KAPULNIK, 1994). A utilização de cepas mutantes excretoras de NH₄⁺ traz influências positivas no crescimento das plantas, quando comparadas às inoculadas com cepas sem esta característica (CHRISTIANSEN-WENIGER & VAN VEEN, 1991).

2.5. EFEITOS DA INOCULAÇÃO

A promoção do crescimento das plantas inoculadas com *Azospirillum* tem sido obtida em condições de campo e casa de vegetação, resultando em mudanças significativas em várias características das plantas. A inoculação pode causar aumento no peso seco e no acúmulo de nitrogênio total da planta, na produtividade e no peso dos grãos, na taxa de germinação das sementes e em mudanças na duração dos estádios de crescimento das plantas (BODDEY & DÖBEREINER, 1988; BODDEY et al., 1986; DIDONET et al., 1996; FAGES, 1994; FALLIK & OKON, 1996; FERREIRA et al., 1987; KAPULNIK et al., 1981; LIN et al., 1983; MILLET et al., 1984; NUR et al., 1980; PANDEY et al. 1998; SILVA et al., 1981; SUMNER, 1990; VLASSAK & REYNERS, 1981).

A produção de fitormônios pelas bactérias *Azospirillum* é considerada o principal fator de promoção do crescimento das plantas (BASHAN & HOLGUIN, 1997; BODDEY et al., 1986;). Nesses casos, o aumento no teor de nitrogênio

total da planta é devido a uma melhor absorção de nitrogênio do solo, por um sistema radicular mais desenvolvido (DIDONET et al., 1996; LIN et al., 1983).

2.6. COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES

O sucesso no rendimento das culturas inoculadas depende, inicialmente, de uma eficiente colonização das raízes das plantas pelas bactérias (JOFRÉ et al., 1998a; OKON & VANDERLEYDEN, 1998). A boa mobilidade, a grande atração quemotática (DEL GALLO & FRENDRIK, 1994; HARTMANN & ZIMMER, 1994) pelas substâncias exsudadas das raízes, a capacidade de mudar a exsudação das raízes e a metabolização dos componentes exsudados e a capacidade de aderência e de supressão dos microrganismos competidores são características importantes dos *Azospirillum* que contribuem para a colonização das raízes (ALEXANDRE et al., 1999; CREUS et al., 1996; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; IGNATOV et al., 1995; JOFRÉ et al., 1998a; PASTORELLI et al 1995; ZHULIN & TAYLOR, 1995).

Para uma mesma substância as respostas quemotáticas são diferentes entre as estirpes de *Azospirillum*. Portanto, a natureza das substâncias exsudadas pelas raízes das culturas traz determinada afinidade entre planta e hospedeiro. A presença de *Azospirillum* produz mudanças na exsudação das raízes e vice-versa, caracterizando, assim, uma interação planta-bactéria, mas o mecanismo desta interação é ainda pouco conhecido (BROEK et al., 1993; DEL GALLO & FRENDRIK, 1994; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; JOFRÉ et al., 1998b; OKON & VANDERLEYDEN, 1998; ZHULIN & TAYLOR, 1995).

Certas estirpes de *Azospirillum* produzem substâncias bactericinas e sideróforas, que inibem grande quantidade de microrganismos competidores, podendo inibir até outras estirpes deste mesmo gênero, além disso, muitas espécies são resistentes a larga faixa de antibióticos, estas características contribuem para melhor colonização das raízes, pela redução na competição pelos nutrientes (BASHAN & LEVANONY, 1990; BASHAN, 1998; DEL GALLO & FRENDRIK, 1994; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; PANDEY et al., 1998).

Estirpes que conseguem colonizar o interior dos vegetais ocupam nichos ecológicos específicos, obtendo uma menor competição pelas fontes nutritivas e mais proteção dos fatores ambientais, de modo que podem suprir melhor a planta com nitrogênio (DÖBEREINER, 1997; KIRCHHOF *et al.*, 1997; SPRENT & JAMES, 1995). A capacidade de colonizar o interior das raízes resulta em estreita relação entre os participantes da associação (REINHOLD & HUREK, 1988).

A colonização das raízes é pré-requisito para que qualquer bactéria altere o desenvolvimento das plantas. A interação entre as raízes das plantas e a atividade das bactérias, a qualidade e a quantidade de substâncias exsudadas pelas raízes e as características genéticas das plantas são fatores que podem auxiliar na colonização das raízes (BROEK *et al.*, 1993; DEL GALLO & FRENDRIK, 1994; KATUPITIYA *et al.*, 1995; KENNEDY *et al.*, 1997; MILLET *et al.*, 1984; PEREG-GERK *et al.*, 1998).

Pouco se conhece das características genéticas dos *Azospirillum* na associação com as plantas. Estirpes com diferentes características em relação à atividade da nitrogenase, produção de fitormônios e nitrato redutase foram estudadas, mas a influência destas características na associação planta-bactéria ainda não foi determinada (BALDANI & DÖBEREINER, 1981; BASHAN & LEVANONY, 1990).

2.7. EXPERIMENTOS DE INOCULAÇÃO

2.7.1. INOCULAÇÃO EM TRIGO

A especificidade na associação planta e estirpe foi observada em experimento realizado com vinte cultivares diferentes de trigo inoculados com a mesma cepa de *A. brasiliense*. Dois cultivares destacaram-se no aumento de componentes do rendimento, como o número de grãos por espiga e o de

espigas por planta, com consequente aumento da produtividade. Estes resultados indicam que genótipos diferentes produzem interações com maior ou menor especificidade com o hospedeiro (MILLET *et al.*, 1984).

As cepas de *A. brasiliense* (Sp 107 st), isolada de raízes de trigo, e *Azospirillum* sp. (Sp 108 st), obtida de raízes de milho, foram comparadas em experimento com trigo realizado a campo. O isolado de trigo foi superior no estabelecimento e infecção das raízes, proporcionando melhor crescimento e incorporação de nitrogênio na planta. As diferenças entre estirpes de *Azospirillum* enfatizam a importância de realizar seleção de estirpes como pré-requisito para o sucesso da inoculação. O aumento na produção de grãos com a cepa Sp 107 st foi 36% superior ao controle sem inoculação, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (BALDANI *et al.*, 1983).

A afinidade entre planta e hospedeiro foi observada na inoculação de várias estirpes de *Azospirillum* sp. em experimento realizado com trigo no Sul do Brasil, cujos resultados mostraram aumentos na produtividade de 10 a 78%, em relação à testemunha, sendo que o melhor desempenho ocorreu com a cepa de *Azospirillum brasiliense* Sp245, isolada de raízes de trigo com a superfície esterilizada. O desenvolvimento de novos métodos de isolamento e seleção de estirpes pode contribuir para encontrar a melhor combinação entre os genótipos (BODDEY *et al.*, 1986, citado por DÖBEREINER & PEDROSA, 1987).

A cepa de *Azospirillum lipoferum*, isolada de raízes de trigo, foi utilizada na inoculação em experimento com trigo. O efeito da inoculação sobre a produtividade foi significativamente superior quando comparado ao controle. Nos tratamentos onde a inoculação foi associada a doses intermediárias de nitrogênio (40 e 80 kg.ha^{-1}) também houve aumento na produtividade, mas estes efeitos não foram observados quando a inoculação foi associada com a aplicação de 120 kg.ha^{-1} de nitrogênio (RAI & GUAR, 1998).

Resultados obtidos em experimentos com trigo, realizados a campo na Índia, mostram que os tratamentos inoculados associados a baixas doses de nitrogênio mineral (0 a 40 kg.ha^{-1}) obtiveram aumento no rendimento de grãos de até 33,9% quando relacionados aos seus controles, em três regiões diferentes; na quarta localidade os maiores aumentos na produtividade foram

observados quando a inoculação foi associada a doses altas de nitrogênio (80 e 120 kg.ha^{-1}), obtendo rendimentos de até $27,1\%$ acima dos respectivos controles. Foram utilizadas variedades diferentes nas quatro regiões (RAO, 1981).

Ensaio a campo com o objetivo de verificar o efeito da inoculação das estirpes de *Azospirillum brasiliense* 245 e JA 04, no cultivar de trigo BR-23, foi implantado no campo experimental da EMBRAPA – CNPT, Passo Fundo, no Rio Grande do Sul. A produção de grãos dos tratamentos que receberam somente a inoculação foi de $14,4$ a $29,1\%$ superior à testemunha. O tratamento que recebeu o inoculante turfa em pó com a cepa JA 04, acrescido de 15 kg.ha^{-1} de nitrogênio, teve o teor de nitrogênio total dos grãos e a produtividade estatisticamente iguais ao tratamento sem inoculação acrescido de 60 kg.ha^{-1} de nitrogênio (DIDONET *et al.*, 1996).

A aplicação de diferentes formulações do inoculante, em experimento de trigo, proporcionou variações no rendimento de grãos, os tratamentos que receberam o inoculante turfa em pó tiveram melhor rendimento que os tratamentos que receberam o inoculante turfa granulada (DIDONET *et al.*, 1996).

O rendimento de grãos do cultivar de trigo EMBRAPA 16 foi avaliado, em experimento a campo, realizado na EMBRAPA-CNPT de Passo Fundo, RS, variando as doses de nitrogênio aplicado e o emprego de inoculante turfa em pó das estirpes *Azospirillum brasiliense* 245 e *Azospirillum lipoferum* 25. A cepa de *A. brasiliense* teve melhor desempenho no rendimento, produzindo $21,5\%$ acima da testemunha, enquanto que a inoculação com *A. lipoferum*, produziu $14,9\%$ acima do controle, quando os tratamentos foram acrescidos com 15 kg de N.ha^{-1} . A porcentagem no aumento da produtividade foi inferior nos tratamentos que utilizaram inoculante associado a 60 kg de N.ha^{-1} , $10,6$ e $6,3\%$ respectivamente (DIDONET, 1998).

2.7.2. INOCULAÇÃO EM CEVADA

A simples inoculação de cevada com *Azospirillum brasiliense*, em experimento realizado na Índia, proporcionou aumento no rendimento de grãos de 26,6% em relação ao controle. Nos tratamentos que receberam inoculação associada a 40 kg de N.ha⁻¹ também houve aumento na produtividade pela melhor eficiência na utilização da fertilização nitrogenada mineral (RAO, 1981).

Com o objetivo de verificar a influência da inoculação das estirpes de *A. brasiliense* 245 e *A. lipoferum* 25 sobre a produtividade do cultivar de cevada cervejeira BR 2, foi conduzido um experimento a campo na EMBRAPA – CNPT, em Passo Fundo, RS. O tratamento que recebeu o inoculante turfa em pó de *A. brasiliense* 245 e ausência de nitrogênio teve um aumento na produtividade de 14,7% acima do controle, enquanto que o inoculado com a estirpe *A. lipoferum* 25 não teve efeito. Na utilização de 45 kg de N.ha⁻¹ associada com a inoculação, a estirpe de *A. brasiliense* 245 teve efeito negativo na produtividade de -9,8%, a segunda estirpe teve um acréscimo na produtividade de 4,2% (DIDONET et al., 1998).

2.7.3. INOCULAÇÃO EM AVEIA

Em geral a simples inoculação com *Azospirillum* aumenta o rendimento das culturas. Em experimento a campo com aveia, em duas regiões na Índia, os dados são contraditórios. A inoculação com *A. brasiliense* e ausência de fertilização nitrogenada mineral, na região de Karnal, proporcionou aumento de 54,6% na produtividade quando comparado ao seu controle, em Ihansi a inoculação teve melhor influência sobre a produtividade com a utilização de 120 kg de N.ha⁻¹ aumentando em 43,8% o rendimento de grãos (RAO, 1981).

2.7.4. INOCULAÇÃO EM MILHO

A influência das condições climáticas sobre a inoculação foi observada em experimento a campo com milho, realizado na Índia, em clima subtropical (1.200 m de altitude) e temperado (1.900 m de altitude). O rendimento da produção de grãos, em clima subtropical, no tratamento inoculado teve aumento estatisticamente significativo quando comparado com o controle, no clima temperado não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Estes resultados são provavelmente causados pelo efeito da baixa temperatura no estabelecimento, na sobrevivência e no crescimento das bactérias no clima temperado, isso indica a necessidade de isolar bactérias nativas capazes de se desenvolverem em altitudes elevadas (PANDEY *et al.*, 1998).

Melhor eficiência na utilização da fertilização nitrogenada mineral ocorreu em plantas de milho inoculadas com *A. lipoferum* CTR1, convertendo em maior conteúdo de nitrogênio e rendimento de grãos nos tratamentos associados com doses intermediárias de fertilização mineral (80 e 160 kg de N.ha⁻¹). O rendimento do tratamento inoculado acrescido de 160 kg de N.ha⁻¹ foi equivalente ao obtido com o tratamento que recebeu 240 kg de N.ha⁻¹. Não houve resposta significativa da inoculação nos tratamentos com 0 e 240 kg de N.ha⁻¹ em relação aos seus controles. Maior taxa de germinação e resistência a seca também foram observadas nos tratamentos inoculados (FAGES, 1994).

A inoculação associada a doses subótimas de fertilização nitrogenada mineral proporcionou maior valorização da fertilização, pela melhor absorção de um sistema radicular mais desenvolvido das plantas inoculadas em relação aos controles, isto reduz consequentemente, a poluição por nitratos das águas subterrâneas (FAGES, 1994; KALOIANOVA & KOSTOV, 1995).

Para a utilização de inoculante a base de *Azospirillum* em sistemas agrícolas, as bactérias devem ser capazes de promover o crescimento das plantas e serem eficientes em vários climas e tipos de solos. Em experimento de milho inoculado com *Azospirillum*, em vários países, os incrementos na produtividade, em relação ao controle, foram maiores em solos com baixo teor de matéria orgânica. Em solos com alto teor de matéria orgânica o efeito da

inoculação sobre a produtividade não foi significativo. Os melhores rendimentos da inoculação, em relação a testemunha, também ocorreram em solos onde os nutrientes são mais limitados. As maiores percentagens no aumento da produtividade foram obtidos nos tratamentos com doses intermediárias de fertilização nitrogenada mineral. A utilização de variedades diferentes de milho, entre os experimentos, traz dificuldades na conclusão dos resultados, pois as diferenças poderiam ser pela variação dos genótipos das plantas ou pelas condições de desenvolvimento. Baseado nos efeitos positivos da inoculação a campo, obtido em solos deficientes em nutrientes, e utilizando doses baixas de fertilização com nitrogênio, o uso de inoculante a base de *Azospirillum* pode ser recomendado nestas condições particulares de crescimento (FALLIK & OKON, 1996).

A utilização de diferentes tipos de formulações do inoculante e vários métodos de aplicação foi testada em experimento realizado com milho utilizando 175 kg de N.ha⁻¹ e, os tratamentos causaram variações na produtividade de -2 a 17% em relação ao controle (FALLIK & OKON, 1996).

A utilização de irrigação, em experimento com milho inoculado com *Azospirillum*, proporcionou aumento na produtividade. Os tratamentos irrigados e inoculados, associados a doses mais baixas de fertilização nitrogenada, tiveram maiores aumentos na produtividade nas duas variedades e densidades de plantas utilizadas, em relação aos tratamentos com doses mais altas de nitrogênio quando comparados aos seus controles. A inoculação com irrigação proporcionou maior percentagem no rendimento em relação aos tratamentos inoculados e não irrigados (FALLIK & OKON, 1996).

Em ensaio conduzido, em sistema de plantio convencional, em área cultivada com ervilhaca no inverno, na EMBRAPA – CNPT em Passo Fundo RS, a inoculação com turfa em pó de *A. brasiliense* 245 e *A. lipoferum* 25 em um cultivar de milho híbrido super precoce proporcionou aumentos na produtividade de grãos acima dos da testemunha de 20,6 e 15,9%, respectivamente. (DIDONET et al., 1998).

2.7.5. COINOCULAÇÃO

Experimentos utilizando a inoculação de *Azospirillum* associada a outros microrganismos que produzem substâncias promotoras de crescimento das plantas, como *Azobacter*, *Rhizobium* e fungos têm sido realizados. A coinoculação aumentou o efeito benéfico sobre as plantas quando comparado com a testemunha ou aos tratamentos que receberam somente um microrganismo (BASHAN & LEVANONY, 1990; OKON & VANDERLEYDEN, 1998).

A coinoculação de *Azospirillum lipoferum* e *Azobacter chroococum* em experimento realizado com trigo, na Índia, teve efeito benéfico, aumentando significativamente a produtividade e a assimilação de nitrogênio, quando comparado com o controle ou com os tratamentos que receberam somente um microrganismo. A interação da coinoculação com doses de nitrogênio foi significativa. (RAI & GUAR, 1981).

2.8. FATORES QUE CAUSAM A INCONSISTÊNCIA DOS RESULTADOS

A inconsistência dos resultados em experimentos de inoculação a campo está relacionada com as condições de campo não controladas, técnicas de inoculação, taxa de inoculação, baixa sobrevivência das estirpes inoculadas, características físicas e químicas do solo, estado fisiológico da bactéria, estirpe imprópria, genótipo da planta, presença de alto número de microrganismos nativos e influência de pesticidas (BASHAN *et al.*, 1995; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; FAGES, 1994; ITZIGSOHN, 1995).

Para a utilização intensiva de inoculante de bactérias associativas necessita-se de um amplo isolamento para selecionar a melhor combinação entre genótipo da planta e estirpe da bactéria, assim como a seleção de bactérias eficientes na colonização das raízes, produtoras de fitormônios, capazes de fixar quantidades significativas de nitrogênio e nitrato redutase.

Também é necessário melhor conhecimento biológico da interação com a rizosfera (BASHAN & LEVANONY, 1990; BODDEY & DÖBEREINER, 1998; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; FREITAS *et al.*, 1981; MILLET *et al.*, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE INOCULANTE

Foram utilizadas as estirpes de *Azospirillum* spp RAM-7 e RAM-5, isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar, provenientes do Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Canã de Azúcar (ICIDCA - CUBA). A produção de biomassa para utilização como inoculante foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em fermentador MDL Marubishi com 8 L de capacidade total (Figura 1).

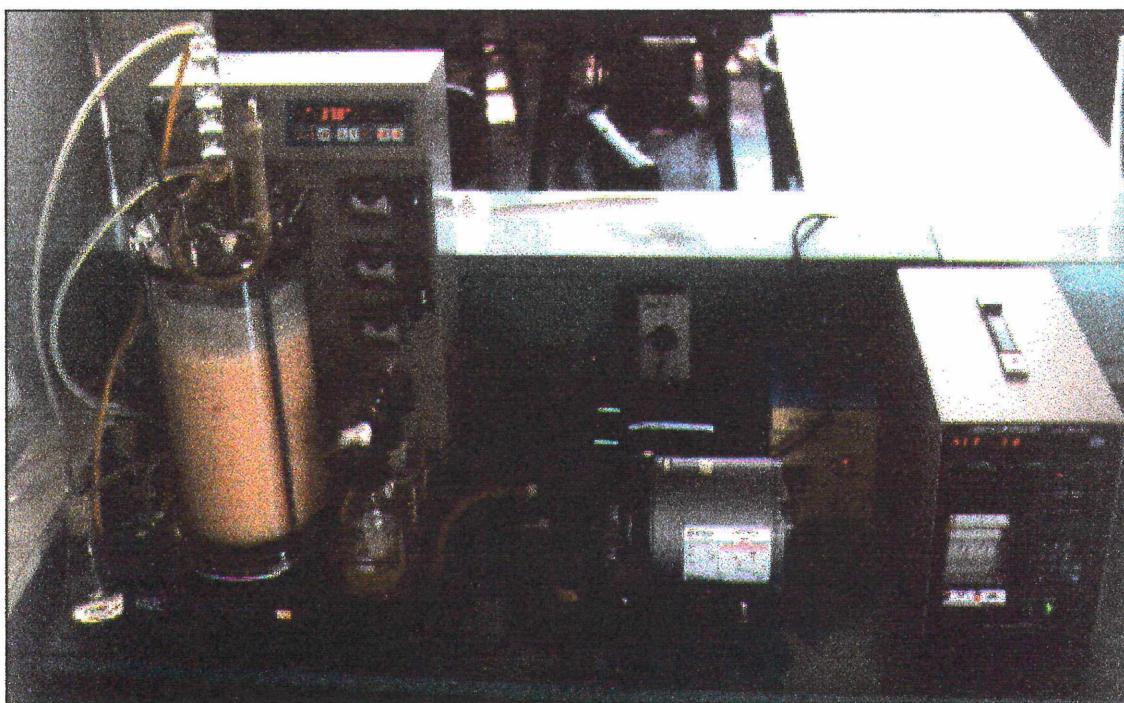


FIGURA 1 – Fermentador MDL Marubishi utilizado na produção de biomassa,
Laboratório de Processos Biotecnológicos, UFPR.

A fermentação foi realizada em biorreator com 5 L de volume do meio ótimo de crescimento com a seguinte composição em g.L⁻¹: frutose = 12,000; extrato de levedura = 1,000; Na₂PO₄ = 4,200; (NH₄)₂HPO₄ = 3,500; MgSO₄.7H₂O = 0,200; KCl = 0,020; Ca Cl₂ = 0,010; NaMoO₄ 2H₂O = 0,010 e FeCl₃ = 0,015. O pH inicial do meio foi ajustado a 7,3. A relação de inóculo utilizada foi de 10% com concentração de 10¹⁰ UFC.mL⁻¹. As fermentações foram realizadas com temperatura de 37º C, agitação de 250 rpm e a aeração de 0,9 v/v, estas condições foram mantidas durante 18 a 20 h, período de duração da fermentação (MICHELENA, et al., 1999), a concentração final obtida foi de 10¹⁰ UFC. mL⁻¹.

O meio fermentado foi mantido em geladeira (4º C) e injetado em pacotes de 200 gramas de turfa em pó esterilizada por radiação gama (provenientes da Empresa NITRAL / URBANA), na concentração de 10⁹ UFC. g⁻¹ de turfa. Os pacotes foram armazenados à temperatura de 4º C, temperatura ambiente (22º C), 28 e 32º C, para verificar a estabilidade das células, por 150 dias. Para o estudo de viabilidade das células, o conteúdo de cada pacote foi colocado em erlenmeyer com 2 L de água estéril com gotas de tween-80 e homogeneizado. Realizaram-se as diluições necessárias e, utilizando o meio de crescimento e diferenciação vermelho congo (MICHELENA, et al., 1999) determinou-se o número de células viáveis por grama do suporte.

3.2 ENSAIOS AGRONÔMICOS

3.2.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O trabalho experimental foi realizado em condições de campo, no ano agrícola de 1998/99, na Estação Experimental do Canguiri do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, em Pinhais, PR, com as culturas de trigo, cevada

e aveia (Figura 2). O experimento com milho foi conduzido no campo experimental da Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária (FAPA), em Guarapuava, PR.

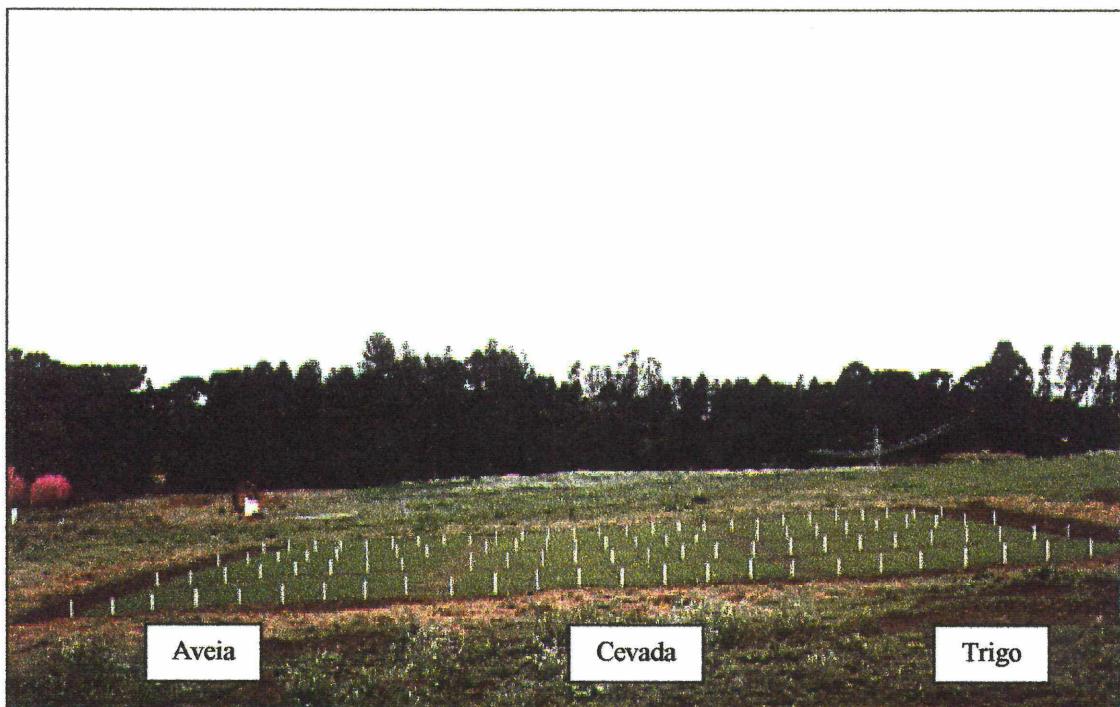


FIGURA 2 – Área utilizada para a implantação dos experimentos de trigo, cevada e aveia, Estação Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99.

3.2.2 SOLO

O solo da Estação Experimental do Canguiri é um Latossolo Vermelho-Amarelo Álico, a proeminente, textura argilosa, fase campo subtropical e relevo suave ondulado (OLMOS et al., 1994 citado por VIEIRA, 1995). Esse solo apresentou as seguintes características químicas, segundo análise realizada pela LABORSOLO de Londrina, PR: $\text{pH}(\text{CaCl}_2) = 5,40$; $\text{Ca}^+ = 6,04 \text{ meq.} 100 \text{ g}^{-1}$; $\text{Mg}^{+2} = 3,30 \text{ meq.} 100 \text{ g}^{-1}$; $\text{K}^+ = 0,23 \text{ meq.} 100 \text{ g}^{-1}$ e $\text{P} = 8,93 \text{ ppm}$.

O campo experimental da FAPA tem o solo classificado como Latossolo Bruno Álico associado com Cambissolo Álico (JASTER *et al.*, 1998). Esse solo apresentou as seguintes características químicas, segundo análise realizada pela COODETEC, de Cascavel, PR: pH(CaCl₂) = 5,20 meq.100 g⁻¹; Ca⁺² = 9,02 meq.100 g⁻¹; Mg⁺² = 2,35 meq.100 g⁻¹; K⁺ = 0,35 meq.100 g⁻¹; P = 9,40 ppm.

3.2.3 ADUBAÇÃO RECOMENDADA PARA CADA CULTURA

A fertilização nitrogenada foi feita, no experimento com aveia, cevada e trigo, parceladamente na semeadura e em cobertura no início do perfilhamento, nas doses respectivas de cada tratamento e a fonte utilizada foi a uréia. No experimento com milho, todos os tratamentos receberam doses iguais de adubação nitrogenada no plantio e, em cobertura, a adubação com uréia foi feita em duas etapas nas doses respectivas de cada tratamento. Além da adubação com nitrogênio foi feita adubação básica de plantio para ambos os experimentos, uniforme para todos os tratamentos, com fósforo e potássio conforme a espécie, utilizando como fontes o super fosfato simples e o cloreto de potássio, (Tabela 1).

TABELA 1 – Adubação utilizada nos experimentos com trigo, cevada, aveia e milho.

CULTURA	N		P ₂ O ₅	K ₂ O
	Semeadura	Cobertura	Semeadura	Kg.ha ⁻¹
TRIGO	20	40	70	40
CEVADA	20	20	70	40
AVEIA	10	30	70	40
MILHO	28	75 + 75	105	70

3.2.4 TRATAMENTOS

Diferentes níveis de nitrogênio mineral associados a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* deram origem aos tratamentos apresentados na Tabela 2, esses tratamentos foram utilizados nos experimentos de trigo, cevada, aveia e milho.

TABELA 2 – Tratamentos utilizados nos experimentos de trigo, cevada, aveia e milho.

TRATAMENTOS	NITROGÊNIO (%)	INOCULANTE
1	0	NI
2	0	IN
3	20	IN
4	40	IN
5	60	IN
6	80	IN
7	100	IN
8	100	NI

% - Da quantidade de adubação nitrogenada recomendada para cada cultura.

NI – Não inoculado.

IN – Inoculado.

3.2.5. INOCULAÇÃO

A inoculação foi realizada pelo método de contaminação das sementes. Para as culturas de trigo, cevada e aveia, nos tratamentos inoculados, as sementes receberam a aplicação da formulação líquida *Azospirillum* RAM-7 e para os experimentos com milho utilizaram-se para a inoculação as estirpes RAM-7 e RAM-5, na formulação turfa em pó. O potencial de inóculo das

sementes realizado em laboratório indicaram a quantidade de 10^6 UFC.g⁻¹ de semente, para todas as culturas.

3.2.6 ÁREA EXPERIMENTAL

As unidades experimentais dos ensaios de trigo, cevada e aveia foram parcelas com 6 fileiras de plantas com 1,0 m de largura por 5,0 m de comprimento, perfazendo 5,0 m² de área total. Na colheita as duas fileiras laterais e 0,5 m de cada extremidade das parcelas foram consideradas bordaduras resultando numa área útil, para fins de avaliação de 1,33 m² (Figura 3).



FIGURA 3 – Detalhe da unidade experimental para as culturas de trigo, cevada e aveia, Estação experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99

No experimento com milho as parcelas foram compostas por 4 fileiras de 8,0 m de comprimento com espaçamento de 0,8 m entre elas perfazendo uma área total de 25,6 m² por unidade experimental. Para fins de avaliação as fileiras laterais e 1,5 m nas extremidades das parcelas foram consideradas bordaduras resultando em 8 m² de área útil.

3.2.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi o de blocos ao acaso com quatro repetições para cada tratamento.

3.2.8 PREPARO DO SOLO

Para a instalação dos ensaios de trigo, cevada e aveia a área foi capinada e limpa, em seguida as unidades experimentais foram sulcadas, manualmente, e a adubação correspondente de cada tratamento foi distribuída e misturada ao solo para evitar o contato direto com as sementes.

Os experimentos com milho foram realizados em sistema de plantio direto em área cultivada com aveia branca para a colheita de grãos. Os sulcos e a distribuição da adubação básica do plantio foi realizada por implementos agrícolas utilizando 350 kg.ha⁻¹ da formulação 8 – 30 - 20.

3.2.9 SEMEADURA E CONDUÇÃO

Para as culturas de inverno a semeadura foi realizada na segunda quinzena de julho de 1998. Para o trigo utilizou-se o cultivar OR-1 e foram

distribuídas 60 sementes por metro, visando uma população final entre 350 e 400 plantas por m² (Reunião da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo, 1999).

Para a cevada seguiram-se as Recomendações da Comissão de Pesquisa de Cevada para o Cultivo de Cevada Cervejeira em 1997 e 1998 (Reunião anual de pesquisa de cevada, 1997). Foram distribuídas 50 sementes por metro do cultivar de cevada cervejeira BR-2, visando obter uma população aproximada de 300 plantas por m².

O cultivar de aveia FAPA-1 foi semeado com 45 sementes por metro linear perfazendo uma população aproximada de 270 plantas por m² (Comissão sul-brasileira de pesquisa de aveia, 1995).

O experimento com milho, utilizando o cultivar híbrido Cargill 909 foi semeado na primeira quinzena de novembro. Foram distribuídas aproximadamente nove sementes por metro e, 15 dias após a emergência, foi feito desbaste deixando aproximadamente 4,4 plantas por metro, visando uma densidade de 55.000 plantas.ha⁻¹.

Foram feitos todos os tratos culturais necessários para o desenvolvimento adequado das culturas, tais como capinas manuais e químicas e aplicações de inseticidas e fungicidas.

3.2.10. VARIÁVEIS AVALIADAS

As variáveis avaliadas estão relacionadas somente com os grãos das culturas.

No trigo, na cevada e na aveia foram avaliadas a produtividade , o peso hectolítico (Grain Analysis computer GAC-2000) e o conteúdo de nitrogênio total (método de Kjeldahl). Para a cevada, também foi avaliada a classificação comercial. O conteúdo de nitrogênio total somente foi avaliado nos tratamentos testemunha, inoculado, inoculado e 100% de N recomendado e o que recebeu somente 100% de N recomendado para os respectivos experimentos.

No milho foram avaliadas a produtividade, peso de mil sementes, % de grãos ardidos, % de nitrogênio total e conteúdo de lipídios (método de Bligh Dyer).

Para fins de análise, os dados da produtividade por unidade experimental, de todas as culturas, foram extrapoladas para kg.ha⁻¹.

Para a avaliação da quantidade de grãos produzidos por kg de nitrogênio aplicado, foi subtraído da produtividade dos tratamentos que receberam a aplicação de nitrogênio químico a produtividade da testemunha e este resultado relacionado com a quantidade de nitrogênio aplicado.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa MSTAT. As variâncias foram avaliadas quanto a homogeneidade pelo teste de Bartlet e, para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTABILIDADE DO INOCULANTE TURFA EM PÓ

Os resultados da estabilidade do inoculante turfa em pó com a estirpe *Azospirillum* RAM-7 em quatro temperaturas diferentes, são apresentados na Figura 4. Para que a bactéria *Azospirillum* promova o aumento do crescimento das plantas é necessário um alto número de células por planta. A utilização comercial de inoculante em larga escala depende do desenvolvimento de formulações que mantenham a viabilidade das células e de técnicas de aplicação nas culturas.

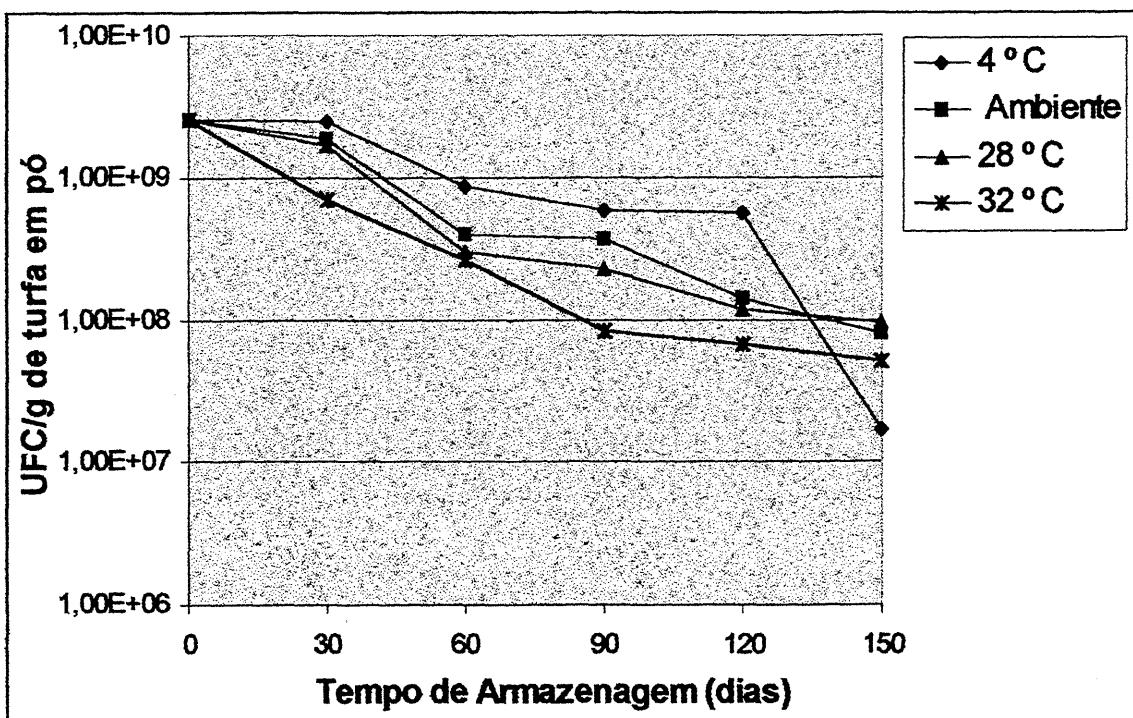


FIGURA 4 – Estabilidade do inoculante *Azospirillum* RAM-7 na formulação turfa em pó armazenado em temperaturas diferentes, Laboratório de Processos Biotecnológicos, UFPR.

Na literatura são encontrados vários estudos (BASHAN & HOLGUIN, 1997; FAGES, 1994; RAO, 1981) buscando desenvolver suportes para as células que atendam a esses objetivos. Neste trabalho, a sobrevivência das células na turfa em pó (Figura 4) ocorreu em maior número quando a formulação foi mantida em geladeira (4° C). Após 120 dias de armazenagem em temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}$ C) e a 28° C, a concentração foi de 10^8 UFC.g⁻¹ de suporte, estes valores foram semelhantes aos encontrados por RAO (1981) e seriam compatíveis com a produção comercial.

4.2 INOCULAÇÃO EM TRIGO

Os tratamentos testados proporcionaram diferenças visuais no desenvolvimento das plantas, conforme mostra a Figura 5. Da esquerda para a direita: IN e 24 kg N.ha⁻¹; IN e 12 kg N.ha⁻¹; IN sem N; 60 kg N.ha⁻¹; IN e 60 kg N.ha⁻¹; Testemunha; IN e 36 kg N.ha⁻¹; IN e 48 kg N.ha⁻¹,

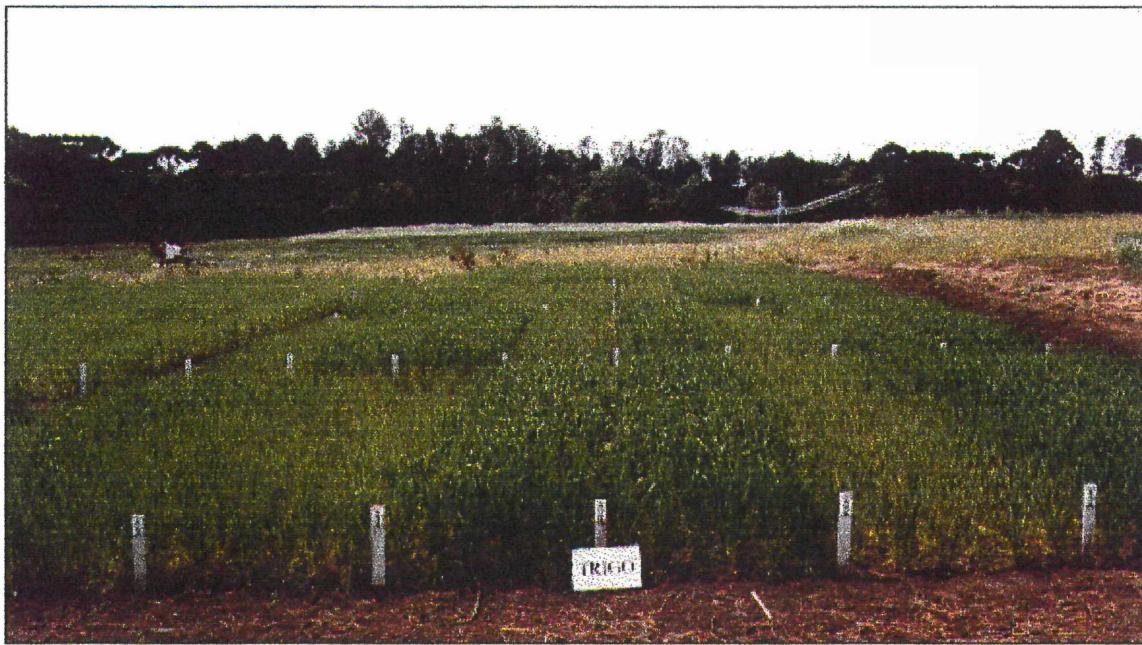


FIGURA 5 – Detalhes das diferenças visuais entre os tratamentos testados no ensaio com trigo, cultivar OR-1 inoculado com *Azospirillum RAM-7*, Estação Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais, PR, 1998/99

As médias de rendimento, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos de trigo são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos de trigo, cultivar OR-1 inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

Tratamentos	Produtividade (kg.ha ⁻¹)	Peso hectolítico (kg.hl ⁻¹)	Nitrogênio total dos grãos (%)
Testemunha	1058 d	69,1 a	1,77 a
Inoculado (IN)	1311 c	70,6 a	1,76 a
IN e 12 kg N.ha ⁻¹	1472 c	70,4 a	Nd
IN e 24 kg N.ha ⁻¹	1793 b	70,1 a	Nd
IN e 36 kg N.ha ⁻¹	1955 b	70,3 a	Nd
IN e 48 kg N.ha ⁻¹	2262 a	71,0 a	Nd
IN e 60 kg N.ha ⁻¹	2420 a	71,1 a	1,71 a
60 kg N.ha ⁻¹	2245 a	69,6 a	1,70 a

¹ Valores seguidos de mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nd – Não determinado

Houve diferença significativa entre os tratamentos sobre a produtividade. O tratamento que recebeu somente a inoculação produziu 23,9% acima da testemunha, sendo semelhante, estatisticamente, ao tratamento IN + 12 kg N.ha⁻¹ ($p<0,05$). Os tratamentos IN + 24 e IN + 36 kg N.ha⁻¹ foram estatisticamente semelhantes e, respectivamente, produziram 70 e 85% mais que a testemunha. Os tratamentos IN + 48 e IN + 60 kg N.ha⁻¹ e o que recebeu apenas 60 kg N.ha⁻¹ foram semelhantes estatisticamente entre si, e superiores aos demais, tendo produzido, respectivamente, 114, 129 e 112% mais que a testemunha. A produção estatisticamente igual dos tratamentos IN + 48 kg N.ha⁻¹ e 60 kg N.ha⁻¹ sem inoculação, mostra neste caso, que a presença do inoculante substituiu 20% da adubação recomendada de nitrogênio (Tabela 3).

Também a presença do inoculante, proporcionou aumento da produtividade em 7,8%, quando comparados os tratamentos com 60 kg N.ha⁻¹.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis peso hectolítico e teor de nitrogênio total.

Considerando a produtividade maior que a da testemunha e relacionando com a quantidade de adubo nitrogenado aplicado, verificou-se que a produtividade do trigo, para cada kg de N aplicado associado a inoculação, foi maior nos tratamentos com doses baixas de nitrogênio, conforme mostra o Figura 6. Quando comparados os tratamentos com 60 kg N.ha⁻¹, a maior eficiência na utilização da adubação nitrogenada ocorreu naquele associado a inoculação. Segundo a literatura, esses aumentos na produtividade pela presença da inoculação ocorrem devido a um sistema radicular mais desenvolvido, ocasionado pela ação de fitormônios produzidos pelas bactéria do gênero *Azospirillum* (BAR & OKON, 1995; BASHAN & HOLGUIN, 1997; BODDEY & DÖBEREINER, 1988).

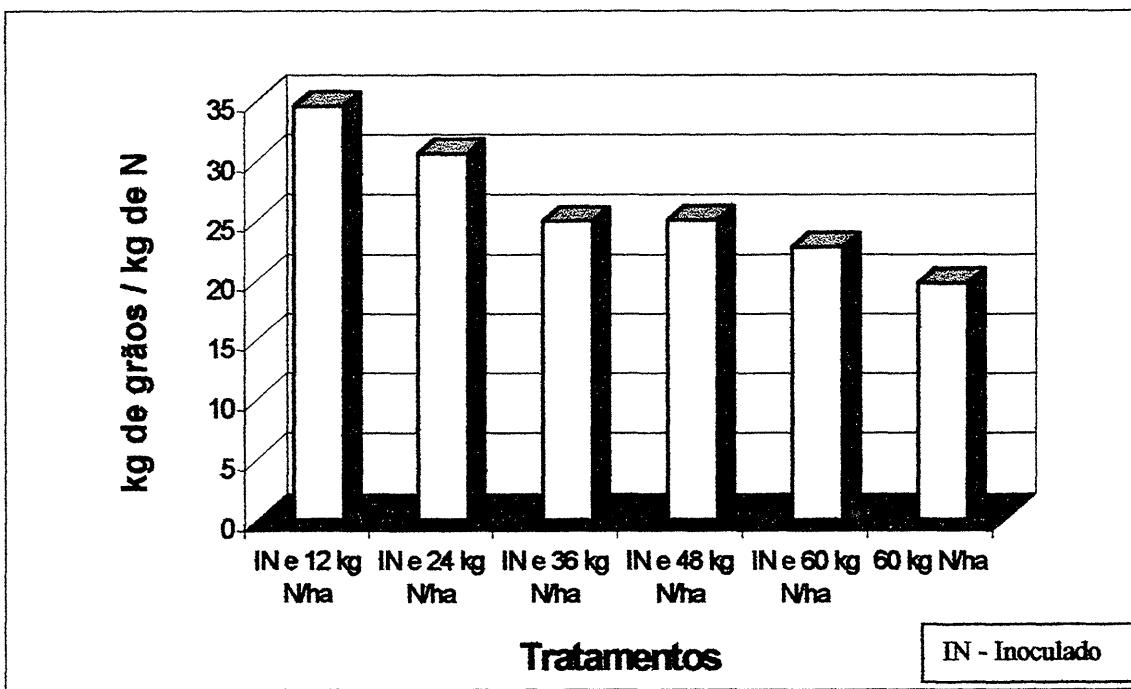


FIGURA 6. Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de trigo, cultivar OR-1, inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

Resultados muito contraditórios são encontrados na literatura sobre os efeitos da inoculação de trigo com *Azospirillum*, porém, efeitos semelhantes aos obtidos neste experimento também foram encontrados por diversos autores, utilizando a inoculação de outras estirpes do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1983; DIDONET *et al.*, 1996; DIDONET *et al.*, 1998; MILLET *et al.*, 1984; RAI & GUAR, 1998; RAO, 1981; SUMNER, 1990).

4.3 INOCULAÇÃO EM CEVADA

As médias de produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos do experimento com cevada são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 – Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos da cevada, cultivar cervejeira BR-2 inoculada com *Azospirillum* RAM-7.

Tratamentos	Produtividade (kg.há ⁻¹)	Peso do hectolitro (kg.hl ⁻¹)	Nitrogênio total dos grãos (%)
Testemunha	1178 e	58,9 b	1,31 b
Inoculado (IN)	1401 de	60,7 a	1,32 b
IN e 8 kg N.ha ⁻¹	1372 e	60,4 ab	Nd
IN e 16 kg N.ha ⁻¹	1713 cd	60,2 ab	Nd
IN e 24 kg N.ha ⁻¹	1839 bc	59,8 ab	Nd
IN e 32 kg N.ha ⁻¹	2158 ab	59,9 ab	Nd
IN e 40 kg N.ha ⁻¹	2355 a	60,1 ab	1,39 a
40 kg N.ha ⁻¹	2184 a	60,1 ab	1,36 ab

¹ Valores seguidos de mesma letras na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nd – Não determinado

Observando os dados apresentados na Tabela 4 pode-se verificar que foram encontradas diferenças significativas para as três variáveis avaliadas. Quanto a produtividade da cevada nota-se que apesar de estatisticamente semelhantes à testemunha, os tratamentos apenas com inoculação e com inoculação e 8 kg N.ha⁻¹, apresentaram produtividades, respectivamente 19 e 16% superiores a ela, isso mostra que a simples inoculação indica tendência para aumento da produtividade na cevada. Isso pode ser comprovada quando se compararam os tratamentos com 40 kg N.ha⁻¹, que também são estatisticamente semelhantes, no entanto, o que tem a inoculação associada é 8% superior ao que só recebeu adubo químico. Também observa-se a produtividade estatisticamente igual entre os tratamentos inoculado e recebendo 32 kg N.ha⁻¹ e aquele que recebeu apenas 40 kg N.ha⁻¹, portanto, com uma economia de 20% da adubação de nitrogênio recomendada. A bibliografia é controvertida nesse caso. Em experimento realizado com esta mesma variedade de cevada, inoculada com a estirpe *Azospirillum brasiliense* 245 aumentou 14,7% a produtividade e com a estirpe *A. lipoferum* 25 não teve efeito; nos tratamentos em que a inoculação foi associada com 45 kg N.ha⁻¹ o efeito sobre a produtividade não foi positivo (DIDONET, 1998).

Quanto ao peso hectolítico da cultura da cevada observa-se, também pela Tabela 4, que apenas o tratamento com inoculação e sem nitrogênio químico foi estatisticamente superior a testemunha e os demais iguais entre si e a testemunha ($p<0,05$). Esses resultados são parcialmente semelhantes aos encontrados para o trigo e aveia no presente trabalho.

Quanto ao nitrogênio total, ainda pela Tabela 4, observa-se que o fornecimento de N químico foi essencial para que sua presença fosse identificada nos tecidos analisados. De qualquer modo, apesar da análise estatística apontar diferenças ($p<0,05$) o acréscimo de N foi de pouco mais de 6%.

Considerando a produtividade maior que a da testemunha e relacionado com a quantidade de adubo nitrogenado aplicado, pode-se observar na Figura 6, que a produtividade de cevada para cada kg de N aplicado foi maior no tratamento inoculado acrescido de 32 kg N.ha⁻¹, produzindo em torno de 35 kg de cevada para cada kg de N aplicado.

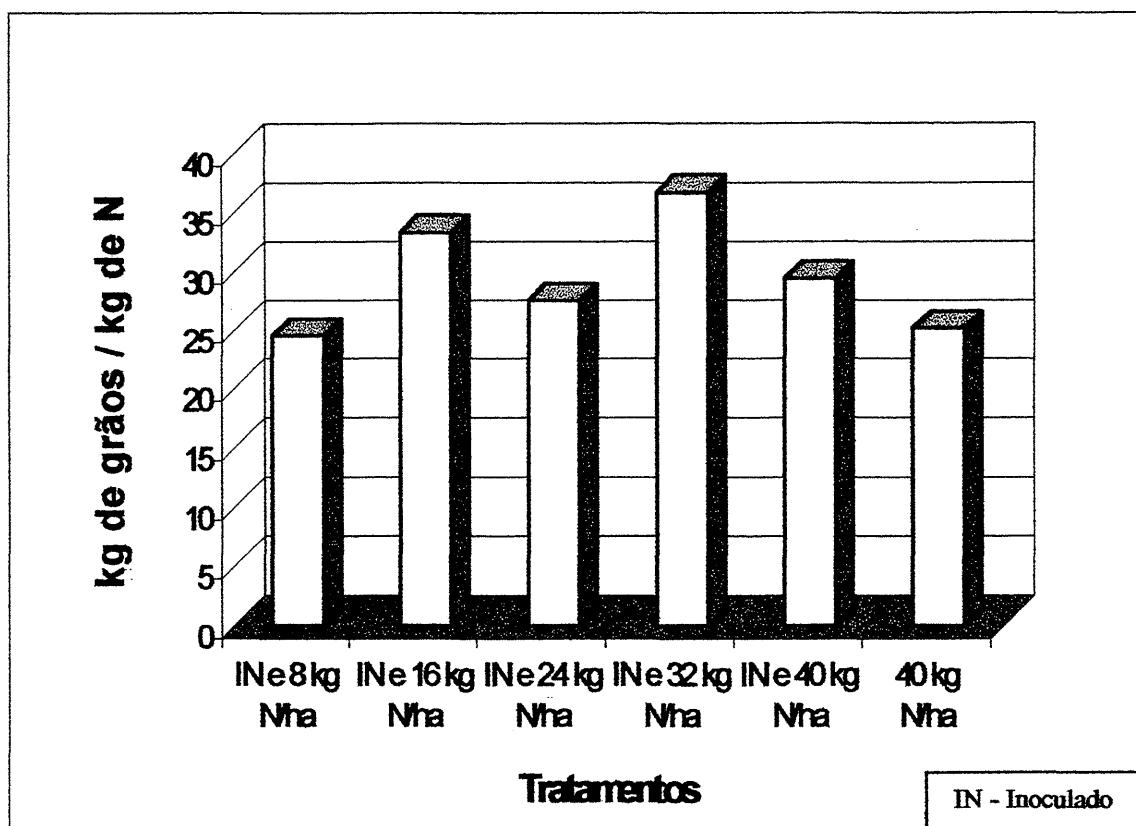


FIGURA 7 – Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de cevada, cultivar cervejeira BR-2, inoculada com *Azospirillum RAM-7*.

A classificação comercial da cevada é uma importante característica comercial e industrial. A média dos dados dessa classificação são apresentadas na Tabela 5. Observa-se que todos os tratamentos com inoculação mostraram tendência de serem melhores para produzir cevada de tipo comercial superior.

TABELA 5 – Classificação comercial da cevada, cultivar cervejeira BR-2 inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

Tratamentos	Tipos comerciais (%)			
	I	II	III	Refugo
Testemunha	47,57	37,23	11,70	3,50
Inoculado (IN)	55,05	31,95	10,32	2,68
IN e 8 kg N.ha ⁻¹	52,12	33,10	11,68	3,10
IN e 16 kg N.ha ⁻¹	52,90	32,35	11,25	3,50
IN e 24 kg N.ha ⁻¹	51,25	33,82	11,43	3,50
IN e 32 kg N.ha ⁻¹	49,68	34,92	11,53	3,87
IN e 40 kg N.ha ⁻¹	51,88	33,32	11,25	3,55
40 kg N.ha ⁻¹	43,75	37,42	13,33	5,50

4.4. INOCULAÇÃO EM AVEIA

As médias dos dados obtidos no experimento em aveia inoculada com a formulação líquida de *Azospirillum RAM-7* são apresentadas na Tabela 6. Pode-se observar que a simples inoculação do cultivar de aveia FAPA-1 com *Azospirillum RAM-7* não teve efeito positivo sobre a produtividade.

O tratamento inoculado acrescido de 32 kg N.ha⁻¹ apresentou produtividade igual a do tratamento com 40 kg N.ha⁻¹, isso indica que com 20% a menos de N conseguiu-se a mesma produtividade, no entanto, houve redução de quase 13% na produtividade do tratamento com menos N químico. Também pela tabela 6, quando comparados os tratamentos que receberam 40 kg N.ha⁻¹ são estatisticamente semelhantes, porém, aquele associado a inoculação é 4,8% superior ao que recebeu somente o adubo químico. Observa-se na bibliografia resultados contraditórios em que em uma localidade os melhores resultados de produtividade encontrados estavam associados a

altas doses de N químico e em outra localidade com a inoculação isolada (RAO, 1981).

Observa-se, também pela Tabela 6 que tanto o peso hectolítico quanto o teor de nitrogênio total dos grãos não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

TABELA 6 – Produtividade, peso hectolítico e teor de nitrogênio total dos grãos no ensaio de aveia, cultivar FAPA-1 inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

Tratamentos	Produtividade (kg.ha ⁻¹)	Peso hectolítico (kg.hl)	Nitrogênio total dos grãos (%)
Testemunha	1711 d	46,3 a	1,27 a
Inoculado (IN)	1688 d	45,9 a	1,28 a
IN e 8 kg N.ha ⁻¹	1762 d	46,3 a	Nd
IN e 16 kg N.ha ⁻¹	2039 cd	46,2 a	Nd
IN e 24 kg N.ha ⁻¹	2189 bc	45,7 a	Nd
IN e 32 kg N.ha ⁻¹	2443 ab	45,7 a	Nd
IN e 40 kg N.ha ⁻¹	2796 a	46,7 a	1,27 a
40 kg N.ha ⁻¹	2668 a	46,9 a	1,24 a

¹ Valores seguidos das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A eficiência da inoculação na produtividade maior que a testemunha, por kg de N aplicado, está apresentada na Figura 8. Quando comparados os tratamentos inoculado acrescido de 40 kg de N.ha⁻¹ e o que recebeu apenas a mesma quantidade de adubo químico apresentaram produtividade, respectivamente, 27 e 24 kg de grãos por kg de N, portanto, a presença da inoculação indica uma tendência de melhor aproveitamento da adubação química na cultura de aveia.

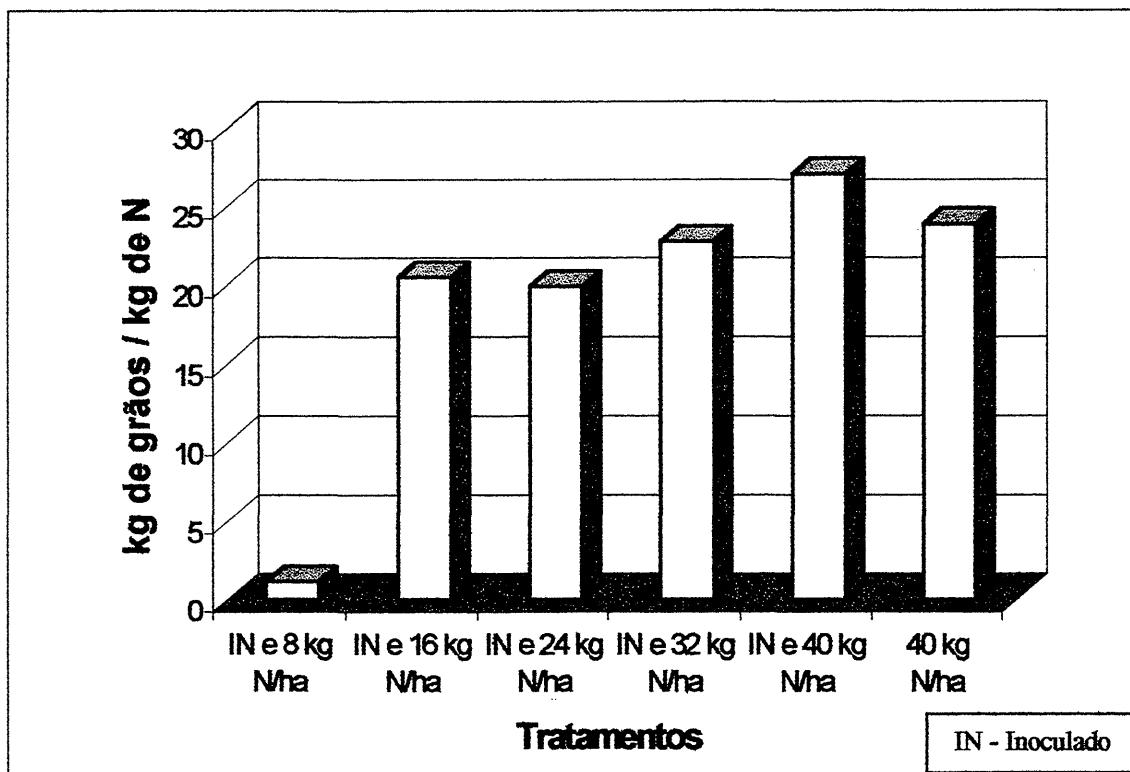


FIGURA 8 – Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de aveia, cultivar FAPA-1, inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

4.5. INOCULAÇÃO EM MILHO

4.5.1. INOCULAÇÃO EM MILHO COM AZOSPIRILLUM RAM-7

As médias de produtividade, lipídios totais e teor de nitrogênio total dos grãos do ensaio de inoculação em milho híbrido Cargill 909 com *Azospirillum RAM-7* são apresentadas na Tabela 7. Houve diferenças significativas do efeito dos tratamentos para essas três variáveis avaliadas.

A simples inoculação aumentou a produtividade em 9,4% quando comparada com a testemunha, embora essa diferença não tenha sido

estatisticamente significativa. Quando comparados os tratamentos que receberam 150 kg N.ha⁻¹ a produtividade foi superior estatisticamente no tratamento associado a inoculação em 13,5%, em relação ao que recebeu somente a adubação nitrogenada.(p<0,05) Observa-se também pela Tabela 7, que o tratamento inoculado acrescido de 90 kg N.ha⁻¹ teve a produtividade estatisticamente igual ao tratamento com 150 kg N.ha⁻¹, portanto, a inoculação neste caso substitui 40% da adubação de nitrogênio recomendada neste experimento.

TABELA 7 – Produtividade, lipídios totais e teor de nitrogênio total dos grãos de milho, cultivar híbrido Cargill 909 inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

Tratamentos	Produtividade (kg.ha ⁻¹)	Lipídios totais dos grãos (%)	Nitrogênio total dos grãos (%)
Testemunha	2686 d	3,04 b	0,89 b
Inoculado (IN)	2939 d	3,22 b	0,92 ab
IN e 30 kg N.ha ⁻¹	5826 bc	Nd	Nd
IN e 60 kg N.ha ⁻¹	5497 c	Nd	Nd
IN e 90 kg N.ha ⁻¹	6518 b	Nd	Nd
IN e 120 kg N.ha ⁻¹	6702 b	Nd	Nd
IN e 150 kg N.ha ⁻¹	7633 a	3,92 a	0,99 a
150 kg N.ha ⁻¹	6720 b	3,91 a	0,94 ab

¹ Valores seguidos das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nd – Não determinado

Para os lipídios totais os tratamentos com 150 kg N.ha⁻¹ acumularam uma maior quantidade destes, quando comparados aos que não receberam nitrogênio. Em relação ao teor de nitrogênio total dos grãos, ainda na Tabela 7, observa-se que o tratamento inoculado associado a 150 kg N.ha⁻¹ foi o que acumulou maior quantidade do que a testemunha (p<0,05).

A eficiência na produtividade maior que a testemunha por kg de nitrogênio adicionado, está representada na Figura 9. A melhor eficiência da utilização do nitrogênio foi observada no tratamento inoculado associado a 30 kg N.ha⁻¹, onde a produtividade foi em torno de 100 kg de grãos para cada kg de N adicionado, enquanto o tratamento que recebeu 150 kg N.ha⁻¹ sem inoculação teve o menor rendimento para cada kg de N aplicado.

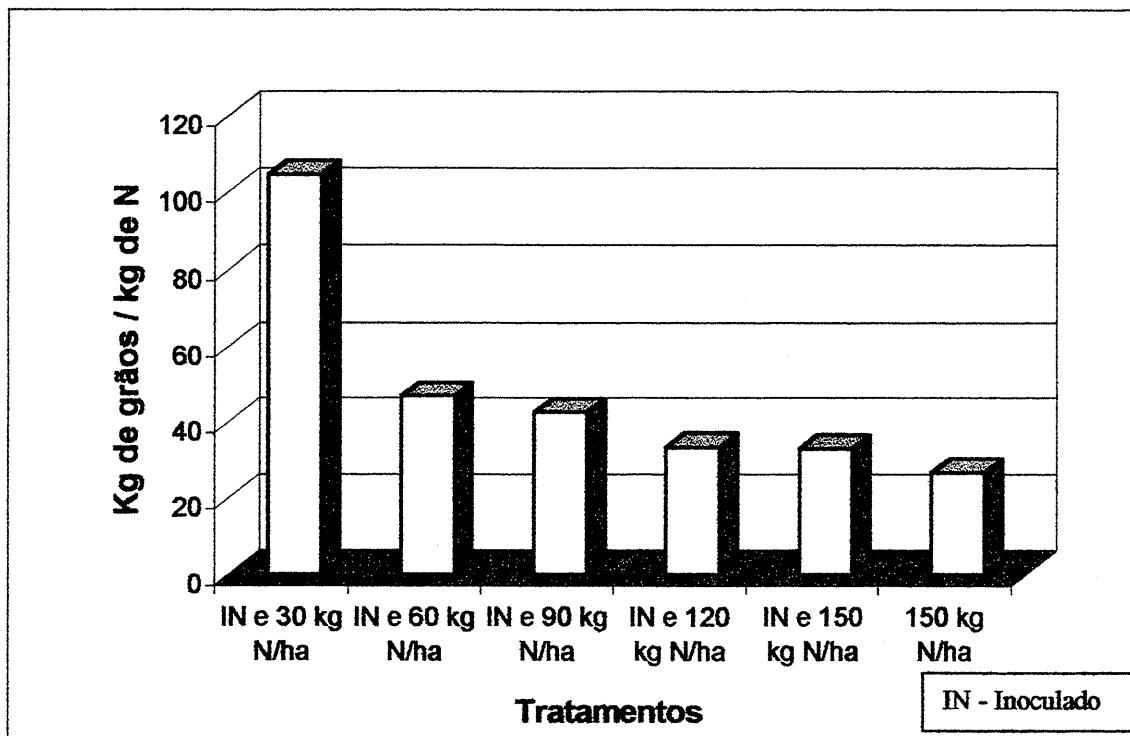


Figura 9. Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a testemunha, por kg de N aplicado, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill 909 inoculado com *Azospirillum* RAM-7.

O efeito dos tratamentos sobre o peso de mil grãos está representado na Figura 10. A presença de nitrogênio nos tratamentos na dose ótima recomendada, associados ou não com a inoculação, tiveram um acréscimo no peso de mil grãos diferindo ($p<0,05$) dos tratamentos sem nitrogênio.

Na Figura 11 observa-se que o desenvolvimento fúngico foi maior nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada ($p<0,05$). A intensidade da ocorrência de grãos ardidos está relacionada com o suprimento de N (FONSECA, 1999 citado por MOLIN, 2000).

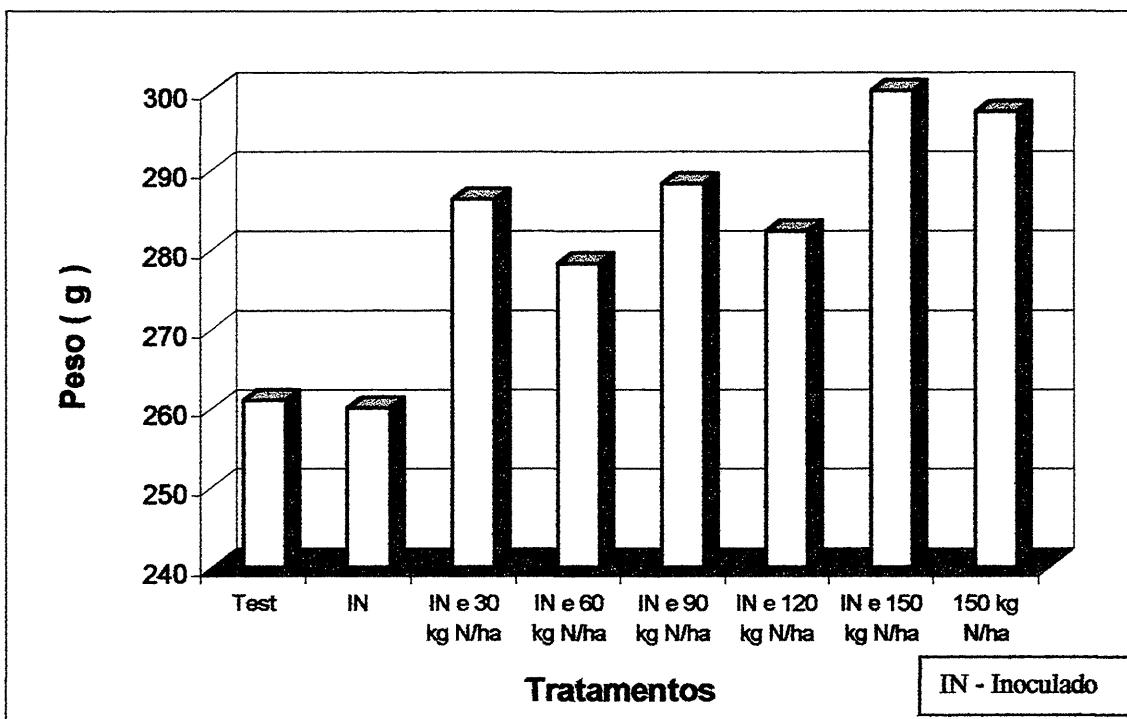


FIGURA 10 – Efeito dos tratamentos sobre o peso de mil sementes, do ensaio de milho, cultivar híbrido Cargil 909, inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

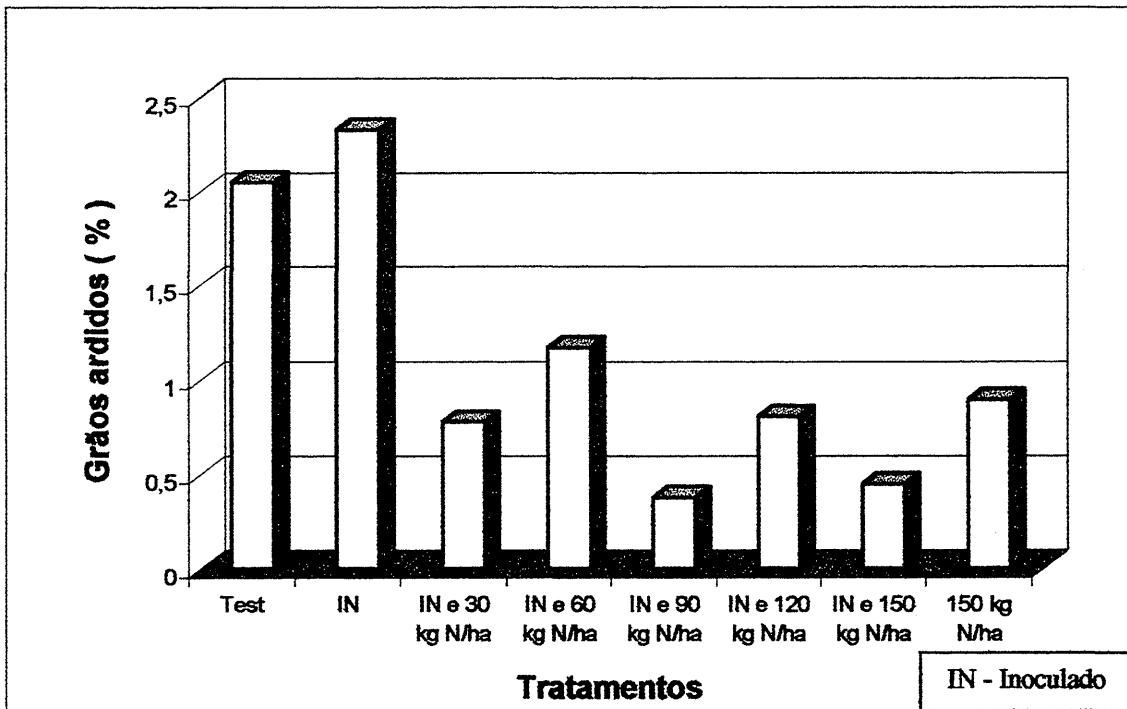


FIGURA 11 – Efeito dos tratamentos na ocorrência de grãos ardidos, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill 909, inoculado com *Azospirillum RAM-7*.

4.5.2 INOCULAÇÃO EM MILHO COM AZOSPIRILLUM RAM-5

Os resultados das médias das avaliações de produtividade, lipídeos totais e teor de nitrogênio total dos grãos de milho, variedade Cargill 909 são apresentados na tabela 8.

TABELA 8 – Produtividade, lipídios totais e teor de nitrogênio total dos grãos de milho, cultivar híbrido Cargill 909 inoculado com *Azospirillum* RAM-5.

Tratamentos	Produtividade (kg.ha ⁻¹)	Lipídios totais	Nitrogênio total
		dos grãos (%)	dos grãos (%)
Testemunha	2.851 d	2,90 b	0,88 a
Inoculado (IN)	3.341 d	3,04 b	0,90 a
IN e 30 kg N.ha ⁻¹	5.201 c	Nd	Nd
IN e 60 kg N.ha ⁻¹	5.508 c	Nd	Nd
IN e 90 kg N.ha ⁻¹	6.615 b	Nd	Nd
IN e 120 kg N.ha ⁻¹	6.957 b	Nd	Nd
IN e 150 kg N.ha ⁻¹	7.765 a	3,34 a	1,00 a
150 kg N.ha ⁻¹	7.311ab	3,35 a	0,96 a

[†] Valores seguidos das mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nd – Não determinado

Observa-se pela análise da Tabela 8 que tanto para a produtividade quanto para os lipídeos totais foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e que para teor de nitrogênio total essas diferenças não foram encontradas ($p<0,05$).

Para a produtividade nota-se que, comparando com o tratamento testemunha (sem N químico e sem inoculante) o tratamento apenas com a

inoculação foi pouco acima que 17% mais produtivo, apesar de não haver significância nessa primeira diferença observada ($p<0,05$). Os tratamentos com inoculação mais 30 e 60 kg N.ha⁻¹ foram estatisticamente iguais e superiores a testemunha em 82 e 93%, respectivamente. Os tratamentos com inoculação mais 90 e 120 kg N.ha⁻¹ foram estatisticamente iguais e superiores aos anteriormente citados, tendo mostrado 132 e 144% a mais em produtividade quando relacionados com a testemunha. Os tratamentos com inoculação mais 150 kg N.ha⁻¹ e o com apenas 150 kg N.ha⁻¹ foram estatisticamente iguais tendo o primeiro deles mostrado superioridade estatística em relação a todos os demais tratamentos. Respectivamente foram 172 e 156% mais produtivos que a testemunha. Observa-se ainda que a diferença de incremento na produtividade entre os tratamento com 150 kg N.ha⁻¹, foi 6% superior naquele que além de 150 kg N.ha⁻¹ teve associado a inoculação. O tratamento inoculado acrescido de 90 kg N.ha⁻¹ teve a produção de grãos estatisticamente igual ao tratamento que recebeu 150 kg N.ha⁻¹, portanto, substituindo 40% de N total recomendado para esse experimento.

Para os lipídeos totais observa-se que a presença de N químico nas doses mais elevadas foi responsável pelo incremento no acúmulo, sendo as diferenças significativas ($p<0,05$). O teor de nitrogênio total dos grãos não foi alterado pelos tratamentos.

A eficiência na utilização da adubação nitrogenada relacionada com a produtividade está apresentada na Figura 12. A melhor eficiência na utilização do nitrogênio foi observada no tratamento inoculado associado a 30 kg N.ha⁻¹, que produziu acima de 70 kg de grãos por kg de N aplicado. Ainda na Figura 12 observa-se que, a medida em que os tratamentos receberam uma maior quantidade de nitrogênio a produção de grãos por kg de N aplicado diminui. Resultados semelhantes em experimentos de milho inoculado com outras estirpes de *Azospirillum*, foram encontrados por outros autores, onde a melhor valorização da fertilização ocorreu em tratamentos inoculados associados a doses baixas de nitrogênio, devido a melhor absorção por um sistema radicular mais desenvolvido das plantas inoculadas (DIDONET, 1998; FAGES, 1994; FALLIK & OKON, 1996; KALOIANOVA & KOSTOV, 1995; PANDEY *et al.*, 1998; SUMNER *et al.*, 1990).

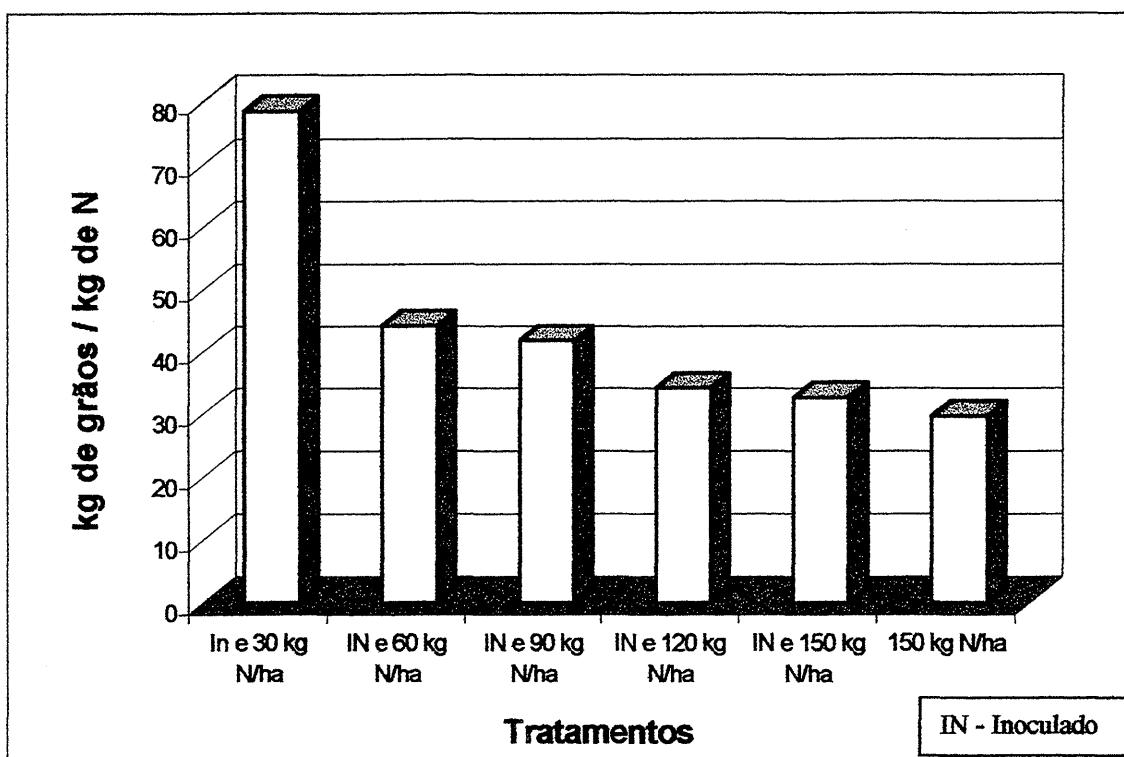


FIGURA 12 – Efeito da inoculação sobre a produtividade maior que a da testemunha, por kg de N aplicado no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill-909, inoculado com *Azospirillum RAM-5*.

O efeito dos tratamentos sobre o peso médio de mil grãos está apresentado na Figura 13. Foi constatada diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos sobre este componente de rendimento. Os tratamentos que receberam 150 kg $N.ha^{-1}$, inoculados ou não, foram significativamente superiores aos dos tratamentos sem nitrogênio. ($p<0,05$). Ainda na Tabela 13 observa-se que com a diminuição de N químico nos tratamentos, o peso médio de mil grãos é menor, portanto, o aumento do peso médio dos grãos está relacionado com o suprimento de nitrogênio para a planta.

A Figura 14 mostra os dados para os grãos ardidos, onde foram constatadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos. O tratamento que recebeu somente a inoculação e o inoculado associado a 30 kg $N.ha^{-1}$ tiveram uma maior porcentagem de grãos ardidos. Os tratamentos que receberam de 60, 90, 120 e 150 kg $N.ha^{-1}$ não diferiram estatisticamente.

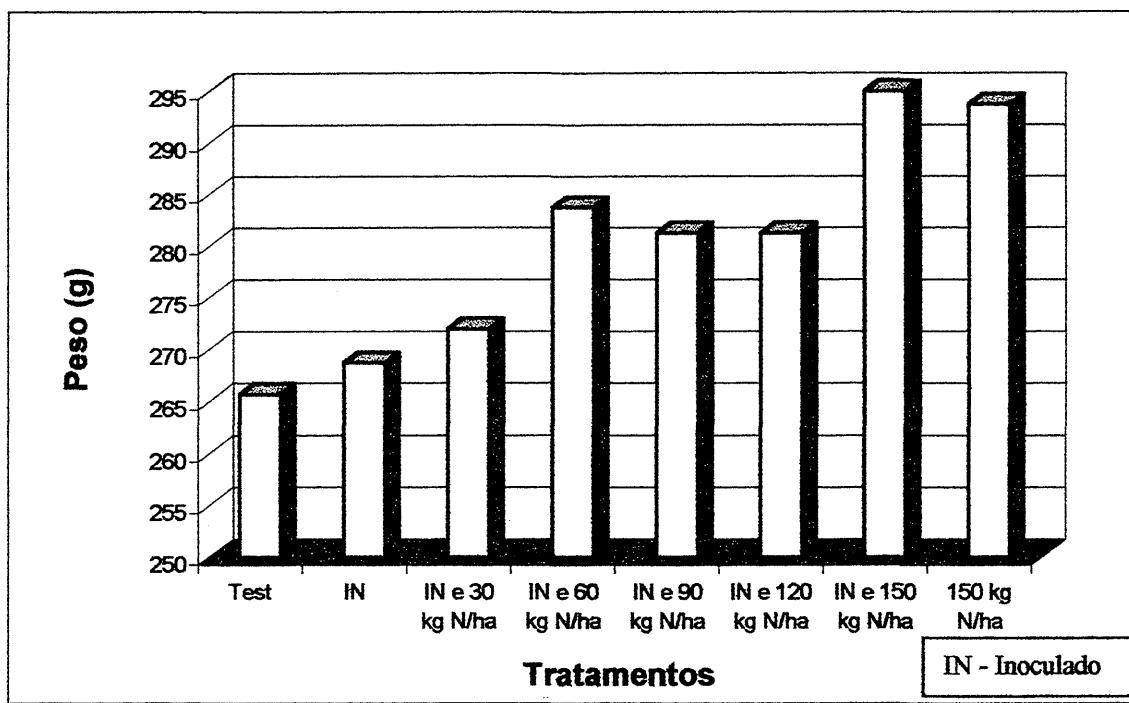


FIGURA 13 – Efeito dos tratamentos sobre o peso de mil sementes, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill 909 inoculado com *Azospirillum RAM-5*

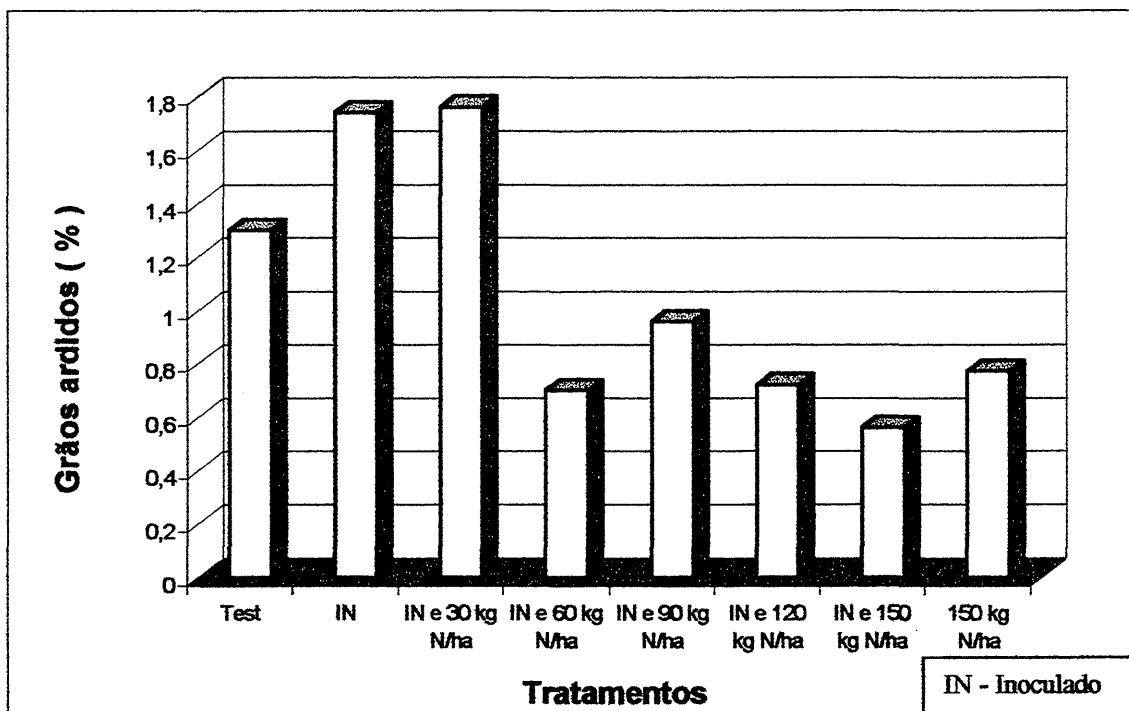


FIGURA 14 – Efeito dos tratamentos na ocorrência de grãos ardidos, no ensaio de milho, cultivar híbrido Cargill 909 inoculado com *Azospirillum RAM-5*.

5 CONCLUSÕES

A formulação inoculante turfa em pó de *Azospirillum* RAM-7 manteve melhor estabilidade das células quando mantida a 4º C, tendo apresentado, após 120 dias de armazenamento, a concentração de $5,8 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ de suporte.

A simples inoculação do cultivar de trigo OR-1 com a formulação líquida de *Azospirillum* RAM-7 proporcionou aumento no rendimento de grãos de 23,9% acima da testemunha ($p<0,05$). A melhor utilização da adubação nitrogenada ocorreu nos tratamentos inoculados associados a doses baixas de N. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao peso hectolítico e ao teor de nitrogênio total dos grãos.

O rendimento de grãos da cevada cervejeira BR-1 foi influenciado positivamente pela inoculação de *Azospirillum* RAM-7. O tratamento inoculado acrescido de 32 kg.ha⁻¹ de N produziu a mesma quantidade do tratamento com 40 kg.ha⁻¹ de N ($p<0,05$) substituindo 20% do nitrogênio recomendado. Maior acúmulo de nitrogênio total nos grãos foi obtido no tratamento inoculado acrescido de 40 kg.ha⁻¹ de nitrogênio em relação aos tratamentos que não receberam fertilização nitrogenada ($p<0,05$). A melhor utilização da adubação nitrogenada mineral foi obtida no tratamento inoculado acrescido de 32 kg.ha⁻¹ de N, onde cada kg de nitrogênio aplicado produziu 36,7 kg de grãos acima da testemunha. A classificação comercial dos grãos foi superior nos tratamentos que receberam a inoculação.

No experimento de inoculação do cultivar de aveia FAPA-1 com *Azospirillum* RAM-7, a simples inoculação não teve efeito sobre a produtividade. A melhor eficiência na produção de grãos por kg de nitrogênio aplicado foi obtida no tratamento inoculado acrescido de 40 kg.ha⁻¹ de N. Os

tratamentos não influenciaram no peso do hectolitro e no teor de nitrogênio total dos grãos. A inoculação substituiu 20% da adubação de N recomendada.

A inoculação de *Azospirillum RAM-7* formulação turfa em pó no cultivar milho híbrido Cargil 909 influenciou positivamente no rendimento. O tratamento inoculado associado a 150 kg.ha⁻¹ de N produziu 13,5% acima do tratamento que recebeu 150 kg.ha⁻¹ de N ($p<0,05$). Houve maior acúmulo de nitrogênio total nos grãos no tratamento inoculado acrescido de 150 k.ha⁻¹ de N. Os tratamentos sem nitrogênio obtiveram um menor teor de lipídios totais nos grãos ($p<0,05$). A maior produção de grãos por kg de N aplicado foi obtida nos tratamentos inoculados associados a baixas doses de N. A inoculação substituiu 40% da adubação de N recomendada.

A inoculação do cultivar milho híbrido Cargil 909 com *Azospirillum RAM-5* aumentou a produtividade e o acúmulo de nitrogênio total nos grãos, porém estas diferenças não foram significativas ($p<0,05$). A porcentagem de lipídios totais foi influenciada pela aplicação de nitrogênio ($p<0,05$). A medida que aumentou o nível de nitrogênio nos tratamentos, diminuiu a eficiência por kg de nitrogênio aplicado na produção de grãos acima da testemunha.

Houve diferenças entre as estirpes inoculadas no mesmo cultivar de milho. Com a estirpe de *Azospirillum RAM-7*, obteve-se maior aumento na produtividade no tratamento com 150 kg.ha⁻¹ de N, já com a estirpe de *Azospirillum RAM-5*, o maior incremento no rendimento foi obtido no tratamento que recebeu somente a inoculação. Respostas diferentes também foram observadas entre as culturas inoculadas com a mesma estirpe. Estes resultados indicam a existência de interações entre os genótipos .

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados mostraram a possibilidade da utilização de inoculante *Azospirillum* em sistemas agrícolas, porém novas investigações devem ser realizadas para que se possa utilizar esta prática agrícola de maneira eficiente:

- Selecionar a melhor combinação entre o genótipo da planta e estirpe da bactéria;
- Isolamento de novas cepas de *Azospirillum* que se destacam na produção de fitormônios e fixação de nitrogênio;
- Estudo da viabilidade econômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, G.; RENÉ, R.; RENÉ, B. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lackes a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagela. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n 10, p. 4701-4704, 1999.
- ARSÈNE, F. et al. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 6, p. 748-757, 1994.
- ASSMUS, B. et al. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.3, p. 1013-1019, 1995.
- 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**, v. 29, p. 924–929, 1983.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of maize, wheat and rice with *Azospirillum* spp. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 131–136.
- BALLY, R.; HAUARAT, J.; NORMAND, P. *Azospirillum* phylogeny based on rrs (16S r RNA gene) sequences. In: FENDRIK, I. et al. **Azospirillum and related microorganisms**. Germany: Springer verlag, 1995. p. 129-135.

BAR, T.; OKON, Y. Conversion of tryptophan, indole-3-pyruvic acid, Indole-3-lactic acid and indole to indole-3 acetic acid by *Azospirillum brasiliense* Sp7. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer verlag, 1995. p.347-359.

BARBIERI, P. et al. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* Cd Affects the Root System Development of *Sorghum bicolor*. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer verlag, 1995. p. 335-340.

BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p.168-174, 1998.

BASHAN, Y. et al. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasiliense*. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer verlag, 1995. p. 441–450.

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.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591-603, 1990.

BODDEY, R. M. et al. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95, p. 109-121, 1986.

BODDEY, R. M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v. 90, p. 265–292, 1986.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with graminaceous plants. In: OKON, Y. **Azospirillum Plant Associations**. USA: CRC Press, 1994. p.119-130.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v. 108, p. 53-65, 1988.

BROEK, A. V. et al. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasiliense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Molecular Plant - Microbe Interactions**, v. 6, n: 5, p. 592-600, 1993.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.14, p. 133–142, 1990.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VAN VEEN, J. A. NH_4^+ - Excreting *Azospirillum brasiliense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 3006-3012, 1991.

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. **Recomendações tecnológicas para o cultivo de aveia**. Passo Fundo: Gráfica e Editora UPF, 1995. p. 13-15.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 83-86, 1996.

DEL GALLO, M.; FRENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y. **Azospirillum Plant Associations**. USA: CRC Press, 1994. p. 57-69.

DIDONET, A. D. **Resultados de pesquisa sobre inoculação de trigo, de cevada e de milho com bactérias do gênero Azospirillum**. Passo Fundo: EMBRAPA/CNPT, 1998. 10 p. Comunicado Técnico.

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

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – Encarte especial**, n.1. p. 2-3, 1997.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do solo**, Campinas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p. 173-180.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. Novas tecnologias biocombustíveis. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 4, p. 16-17, 1998.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. EUA: Springer-Verlag, 1987. 120 p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasilia: EMBRAPA – SPI; Itagui, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995, p. 19–25.

DUNG, N.; KRAUT, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* strains from soil and rice plants in north Vietnam. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms.** Germany: Springer Verlag, 1995. p. 559-565.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. ***Azospirillum Plant Associations.*** USA: CRC Press, 1994. p.88-105.

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

FALLIK, E.; SARIG, S.; OKON, Y. Morfology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: OKON, Y. ***Azospirillum Plant Associations.*** USA: CRC Press, 1994. p. 77-83.

FANI, R. et al. Phylogenetic studies of the genus *Azospirillum*. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms.*** Germany: Springer Verlag, 1995. p. 59-75.

FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasiliense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 1–7, 1987.

FREITAS, J. L. M.; PEREIRA, P. A. A.; DÖBEREINER, J. Effect of organic matter and *Azospirillum* spp. strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 155–163.

GILLIS, M.; REINHOLD-HUREK, B. Taxonomy of *Azospirillum*. In: OKON, Y. **Azospirillum Plant Associations**. USA: CCR Press, 1994. p. 1-14.

GYURJÁN, I. et al. Artificial Plant-Azobacter symbiosis for atmospheric nitrogen fixation. In: FENDRIK, I. et al. **Azospirillum and related microorganisms**. Germany, 1995. p. 401-413.

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. **Azospirillum Plant Associations**. USA: CRC Press, 1994. p. 15-31.

HECHT-BUCHHOLZ, C. The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixation bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. **Z. Pflanzenernähr. Bodenk.**, v. 161, p. 509-520, 1998.

HUBBELL, D. H. et al. Physiological interaction in the *Azospirillum*-grass root association. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 1–6.

HUNGRIA, M. et al. **Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo**. Londrina: EMBRAPA/CNPS, 1997. n. 56, 10 p. Comunicado Técnico

IGNATOV, V. et al. Interactions between partners in the association “wheat-*Azospirillum brasiliense* Sp 245”. In: FENDRIK, I. et al. **Azospirillum and related microorganisms**. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 271-290.

IOSIPENKO, A.; IGNATOV, V. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasiliense* Sp 7. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p.307-317.

ITZIGSOHN, R. et al. Inoculation effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annus*) under different fertilization and irrigation regimes. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 503–513.

JAIN, D. K.; BEYER, D.; RENNIE, R. J. Dinitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by bacterial strains at various temperatures. **Plant and Soil**, v. 103, p. 233-237, 1987.

JASTER, F. et al. Ensaio de manejo de solo e métodos de calagem. In: WOBETO, C.; SANDINI, I. E. **Milho & soja - Resultados de Pesquisa**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 1998. p. 329.

JOFRÉ, E. et al. Differential gene expression in *Azospirillum brasiliense* Cd under saline stress. **Canadian Juornal of Microbiology**, v. 44, p. 929-936, 1998a.

JOFRÉ, E. et al. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasiliense* Cd to maize and wheat roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 416-422, 1998b.

KALOIANOVA, N.; KOSTOV, O. Dominant N₂-fixing microflora in a paddy soil and effect of rice inoculation with *Azospirillum* bacteria. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 555–566.

KAPULNIK, J. et al. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. **Plant and Soil**, v. 61, p. 65-70, 1981.

KATUPITIYA, S. et al. A mutant of *Azospirillum brasiliense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1987-1995, 1995.

KATZY, H. et al. Genetical aspects of indole acetate production in *Azospirillum brasiliense* Sp245. In: FENDRIK, I et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 113-119.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: COLLINS, H. P.; ROBERTSON, G. P.; KLUG, M. J. **The significance and Regulation of Soil Biodiversity**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 75-84.

KENNEDY, I. R. et al. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v. 194, p. 65-79, 1997.

KIRCHHOF, V. M. et al. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, v. 194, p. 45-55, 1997.

KUCEY, R. M. N. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 735-739, 1988.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W .F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1775-1779, 1983.

MACHADO, H. B. *et al.* Promoção do crescimento vegetal por *Azospirillum*: fato ou ficção? In: **Encontro Paranaense de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, Iº**, 1998, Londrina. p. 12-17.

MICHELENA, G. *et al.* Obtención de un inoculante comercial a partir de *Azospirillum* sp. en condiciones brasileñas. Revista: ICIDCA "Sobre los derivados de la caña de azúcar". n. 2, v. 33, 1999.

MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; ELMERICH, C. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. **Azospirillum Plant Associations**. USA: CRC Press, 1994. p.32-56.

MILLET, E.; AVIVI, Y.; FELDMAN. Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasiliense*. **Plant and Soil**, v. 80, p. 261-266, 1984.

MOLIN, R. Ocorrência e prevenção de grãos ardidos e micotoxinas na cultura do milho. In: SANDINI, I. E.; FANCELLI, A. L. **Milho: Estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p.117-129.

NUR, I.; OKON, Y.; HENIS, Y. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 482-485, 1980.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, p. 3-16, 1986.

OKON, Y; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Features**, v. 63, n 7, p. 366-370, 1998.

OLUBAYI, I. et al. Differences in chemical composition between nonflocculant and flocculated *Azospirillum brasiliense* Cd. **Canadian Journal Microbiology**, v. 44, p. 386-390, 1998.

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the sikkim himalaya. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 379-384, 1998.

PASTORELLI, R.; GORI, A. FAVILLI, F. Adhesion of rhizosphere bacteria to roots of maize and wheat. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 543-547.

PAYNE, W. J.; SHERR, B. F.; CHALMERS, A. Nitrification-denitrification associated with plant roots. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 37-48.

PEDROSA, F. O.; STEPHAN, M. S. P.; DÖBEREINER, J. Interaction of nitrogenase and uptake hydrogenase activities in *Azospirillum brasiliense*. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 15-25.

PEREG-GERK, L. et al. A transcriptional regulator of the luxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasiliense* Sp7. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 3, p. 177-187, 1998.

PÖTTKER, D. Recentes avanços no manejo químico do solo para a cultura do milho. In: SANDINI, I. E.; FANCELLI, A. L. **Milho: Estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p.63-87.

RAI, S. N.; GUAR, A. C. Characterization of *Azobacter* spp. and effect of *Azobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and N-uptake of wheat crop. **Plant and Soil**, v.109, p. 131-134, 1988.

RAO, N. S. S. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in Índia. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 137–144.

RECOMENDAÇÕES técnicas para a cultura de milho no Estado do Rio Grande do Sul – Porto Alegre: FEPAGRO; EMATER/RS; FECOAGRO/RS. p. 34-35, 1999 (Boletim técnico, n.6)

REINHOLD, B.; HUREK, T. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. **Plant and Soil**, v. 110, p. 259-268, 1988.

REUNIÃO anual de pesquisa de cevada, 17., 1997, Passo Fundo. **Recomendações da comissão de pesquisa de cevada para o cultivo de cevada cervejeira em 1997 e 1998.**, Passo Fundo: Embrapa-CNPT, p. 15-16, 1997.

REUNIÃO da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo, 15., 1999, Dourados, MS.. **Recomendações da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo para 1999.**, Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1999. p. 14-15.

SANDINI, I. E. A cultura do milho na Cooperativa Agrária. In: SANDINI, I. E.; FANCELLI, A. L. **Milho: Estratégias de manejo para a região sul.** Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 1–21.

SILVA, W. J.; ARRUDA, P.; RUSCHEL, A. P. Plant characteristics and nitrogenase activity in five inbred lines of maize. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation.** Florida: CRC Press, 1981. v. 1, p. 179–184.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. N₂-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK, I. et al. **Azospirillum and related microorganisms.** Germany: Springer Verlag, 1995. p. 15-30.

STEPHAN, M. P.; PEDROSA, F. O.; DÖBEREINER, J. Physiological studies with *Azospirillum* spp. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation.** Florida: CRC Press, 1981. p. 7–14.

SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. In: STEWART, B. A **Advances in Soil Science.** New York: Springer Verlag, 1990. 120 p.

SUNDARAM, S.; ARUNAKUMARI, A.; KLUCAS, R. V. Characterization of Azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 212-217, 1988.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967–980, 1978.

VANCE, C. P. Nitrogen fixation in agriculture: Where are the needs? **Internacional Congress on Nitrogen Fixation, 12th**, 1999, Fóz do Iguaçú, Paraná. p. 9. (Abstract).

VANDERLEYDEN, J. et al. *Azospirillum*-Cereals: An Intriguing Partnership. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum* and related microorganisms**. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 47-57.

VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C.; VARGAS, A. A. T. O Ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do Solo**. Campinas, 1992. p. 105–117.

VIEIRA, S. M. Efeitos isolados ou associados de nitrogênio, molibdêmio e inoculante sobre o rendimento e seus componentes de duas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Curitiba, 1995. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

VLISSAK, K.; REYNERS, L. Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by *Azospirillum* spp. in temperate region. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 93–101.

VOLPIN, H.; KAPULNIK, Y. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: OKON, Y. ***Azospirillum Plant Associations***. USA: CRC Press, 1994. p. 111-116.

VOLPON, A. G. T.; DE-POLLI, H.; DÖBEREINER, J. Changes in efficiency of nitrogen fixation in various growth stages of batch cultures of *Azospirillum lipoferum*. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation**. Florida: CRC Press, 1981. p. 111–116.

ZAMAROCZY, M. Genetic control of nitrogen assimilation and nitrogen fixation in free living *Azospirillum brasiliense*: A review. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 77-89.

ZHULIN, I.; TAYLOR, B. L. Chemotaxis in plant-associated bacteria: the search for the ecological niche. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 451–459.

ZIMMER, W. et al. Auxin biosynthesis and denitrification in plant growth promoting bacteria. In: FENDRIK, I. et al. ***Azospirillum and related microorganisms***. Germany: Springer Verlag, 1995. p. 121-128.