

# Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas<sup>1</sup>

Leandro Hahn<sup>2</sup>; Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>3</sup>; William Rosa da Silva<sup>4</sup>; Rafael Goulart Machado<sup>5</sup>;

Raquel Garibaldi Damasceno<sup>6</sup>

**Resumo** – Apesar dos resultados positivos na promoção de crescimento de plantas de milho com a inoculação de bactérias diazotróficas, tem sido mostrado que existem variações nas interações entre híbridos de milho e bactérias diazotróficas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da inoculação de rizóbios, simbioses em leguminosas, e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de híbridos de milho. Plantas de milho de cinco híbridos cultivadas em vasos foram inoculadas com os rizóbios UFRGS Vp16 e SEMIA 222 e a combinação de três bactérias diazotróficas associativas do gênero *Azospirillum* (UFRGS Lg1-R, UFRGS El-S e UFRGS M-S). A inoculação das bactérias mostrou haver respostas na promoção de crescimento dependentes dos híbridos de milho. A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 aumentou o crescimento dos híbridos de milho 30F53, NB 7205, 30R50 e Fórmula, porém não teve efeito de promoção de crescimento sobre o híbrido de milho AS 1572. A inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* aumentou o crescimento dos híbridos de milho 30F53, NB 7205 e AS 1572, porém nos híbridos 30R50 e Fórmula não teve efeito de promoção de crescimento.

**Palavras-chave:** *Zea mays*. Fixação biológica de N. 16S DNAr. *Azospirillum*. *Burkholderia*.

## Growth promotion of maize hybrids inoculated with rhizobia and diazotrophic associative bacteria

**Abstract** – Despite positive results in growth promotion of maize with inoculation of diazotrophic bacteria, it has been shown that there are variations in the interactions between hybrids and these bacteria. The aim of this study was to evaluate the efficiency of rhizobia symbioses of legume and diazotrophic bacteria inoculation on growth promotion of maize hybrids. Maize plants grown in pots of five maize hybrids were inoculated with the rhizobia UFRGS VP16 and SEMIA 222 and a combination of three diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* (UFRGS Lg1-R, UFRGS El-S and UFRGS MS). The bacteria inoculation showed growth promoting response dependent on maize hybrids. Inoculation of rhizobia UFRGS Vp16 increased growth of maize hybrid 30F53, NB 7205, 30R50 and Formula, but not has growth promotion effect on the hybrid maize AS 1572. Inoculation combination of three isolates of *Azospirillum* increased growth of maize hybrid 30F53, NB 7205 and AS 1572, but not has growth promoting effect on the hybrids 30R50.

**Key words:** *Zea mays*. Biologic N fixation. 16S DNAr. *Azospirillum*. *Burkholderia*.

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em 09/04/2013 e aprovado para publicação em 15/04/2014.

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, EPAGRI/Estação Experimental de Caçador, e Professor FAI Faculdade de Itapiranga, C.P. 591, CEP 89500-000 Caçador-SC. E-mail: [leandrohahn@epagri.sc.gov.br](mailto:leandrohahn@epagri.sc.gov.br)

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Associado do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS, E-mail: [enilson.sa@ufrgs.br](mailto:enilson.sa@ufrgs.br)

<sup>4</sup> Estudante Agronomia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS.

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, estudante PPG em Ciência do Solo, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS.

<sup>6</sup> Bióloga, estudante PPG em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 52, CEP 90050-170, Porto Alegre-RS.

## Introdução

O cultivo do milho apresenta grande importância econômica para o Brasil, que é o terceiro maior produtor mundial, com cerca de 56 milhões de toneladas na safra 2010/2011 e mais de 13 milhões de hectares cultivados (IBGE, 2012). No entanto, o rendimento médio das lavouras brasileiras é ainda baixo, 4200 kg ha<sup>-1</sup>, o que revela a necessidade de melhorias consideráveis no sistema de produção deste cereal.

O aumento do fornecimento de nitrogênio (N) via fixação biológica (GARCÍA DE SALAMONE et al., 1996) ou o aumento de sua absorção pela planta (HUNGRIA et al., 2010) seriam formas pelas quais os micro-organismos promotores de crescimento poderiam contribuir para melhorar a produção de milho sem a necessidade de se utilizar maiores doses de N mineral. A promoção de crescimento por micro-organismos pode ser uma consequência da fixação biológica de N (MONTAÑEZ et al., 2009), da produção de fitoreguladores como auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1992), do antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (SCHER e BAKER, 1982), competição por nutrientes ou por indução de resistência sistêmica adquirida (PIETERSE et al., 2003), ou por aumentar a disponibilidade de minerais como fósforo (SESSITSCH et al., 2002).

Para o milho, é bem documentada a sua capacidade de estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas com promoção do crescimento das plantas com vários gêneros bacterianos (CHELIUS e TRIPLETT, 2000; CABALLERO-MELLADO et al., 2004). No Brasil, o isolamento e seleção de estirpes de *A. brasilense* eficientes em promover o crescimento de milho por Hungria et al., (2010), permitiu o registro e comercialização do primeiro produto inoculante para esta cultura.

Além desses gêneros, tem havido grande interesse em estudar e utilizar rizóbios isolados de nódulos de leguminosas como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas. Resultados positivos na promoção de crescimento com a inoculação de rizóbios já foram obtidos em arroz (OSÓRIO FILHO, 2009; YANNI e DAZZO, 2010; BHATTACHARJEE et al., 2012) e em milho, porém em menor número de trabalhos (GUTIERREZ-ZAMORA e ROMERO, 2001, BÉCQUER et al., 2011).

Apesar dos resultados positivos na promoção de crescimento de plantas de milho com a inoculação de bactérias, constatou-se que existem variações nas interações entre híbridos de milho e bactérias diazotróficas (GARCÍA de SALAMONE et al., 1996, MONTAÑEZ et al., 2009 e WALKER et al., 2011). Essas observações sugerem que a promoção de crescimento seja dependente da interação entre o genótipo da planta e dos micro-organismos envolvidos nessas associações para expressar ao máximo sua capacidade de promoção de crescimento.

Diante da grande variabilidade de respostas das plantas de milho à inoculação com bactérias promotoras de crescimento, torna-se necessária a identificação das melhores associações entre bactérias diazotróficas e genótipos de milho com vistas a se obter o maior incremento no crescimento das plantas e o maior aproveitamento dos nutrientes. Ainda é pouco estudada essa interação, especialmente a de rizóbios, eficientes na fixação simbiótica de N em leguminosas, com plantas não-leguminosas (MISHRA, 2006), e pouco se sabe sobre a resposta de híbridos de milho cultivados no Rio Grande do Sul à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal. O estudo dos efeitos das interações entre plantas e micro-organismos promotores de crescimento torna-se de fundamental importância para que se possa recomendar as melhores combinações entre bactérias selecionadas e híbridos de milho para cultivo comercial desse cereal. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da inoculação de rizóbios, simbiontes em leguminosas, e bactérias diazotróficas associativas na promoção de crescimento de híbridos de milho.

## Material e métodos

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os rizóbios avaliados foram UFRGS Vp16, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, que foi isolado de nódulos de plantas de trevo branco (ALVES 2005) e a estirpe SEMIA 222, liberada para produção de inoculantes para trevo branco, obtida da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Avaliou-se também uma mistura de três isolados de *Azospirillum*, sendo UFRGS Lg1-R, obtido de raízes de plantas de milho

coletadas em Eldorado do Sul (RS), UFRGS El-S, obtido da rizosfera de plantas de milho coletadas em São Luiz Gonzaga (RS), e UFRGS M-S, obtido da rizosfera de plantas de milho coletadas em Marau (RS). Estes isolados foram selecionados pela produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro* e pela alta eficiência na fixação biológica de N em milho cultivado no Rio Grande do Sul (RÖESCH, 2007).

Para a identificação dos isolados UFRGS Vp16, UFRGS Lg1-R, UFRGS El-S e UFRGS M-S, o DNA total das bactérias foi extraído usando o Wizard kit (Promega). A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada usando os primers universais F515 e R806 (BATES et al., 2011). As reações de PCR usando os primers universais foram realizadas em um volume de 20 µl contendo 1µl de DNA, 1x tampão PCR, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM dos primers e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os ciclos empregados para amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 25 ciclos incluindo desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 55°C, e extensão por 1 minuto a 72°C, seguido por uma etapa final de extensão de 6 minutos a 72°C. Os fragmentos foram sequenciados usando equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências parciais da região 16S DNAr dos isolados foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0.

Os três tratamentos com bactérias foram avaliadas em cinco híbridos de milho comumente cultivados no estado do Rio Grande do Sul: híbrido AS 1572 (Agroeste Seeds), 30R50 e 30F53 (Pioneer Seeds) e NB 7205 e Fórmula (Syngenta Seeds). No experimento, foram usados vasos plásticos de 2 L contendo uma mistura 2:1 de vermiculita e areia, esterilizada em autoclave por 90 minutos a 120°C, e solução nutritiva estéril (SARRUGE, 1975). O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições. Os cinco híbridos de milho e as inoculações dos três tratamentos com os isolados bacterianos foram combinadas com uma dose equivalente a 60 kg ha<sup>-1</sup> e uma dose equivalente a 120 kg ha<sup>-1</sup>. Além desses tratamentos, foram conduzidos dois tratamentos controle, controle N/2 - controle não inoculado com plantas dos híbridos de milho que receberam dose de N equivalente a 60 kg ha<sup>-1</sup> e controle N - controle

não inoculado dose de N equivalente a 120 kg ha<sup>-1</sup>.

As sementes de milho foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por um minuto, e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Na sequência, cinco sementes foram semeadas em cada vaso e cinco dias após, foi realizado o raleio, sendo mantidas duas plantas por vaso. O N foi adicionado semanalmente, por meio de alíquotas de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (2,87 g L<sup>-1</sup>). Aplicou-se 5,0 e 10,0 mL desta solução por vaso nos tratamentos que receberam, respectivamente, uma dose equivalente a 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Para a produção do inóculo, os rizóbios (UFRGS Vp16 e SEMIA 222) foram inoculados, isoladamente, em meio levedura manitol líquido (LM) (Vincent 1970), e os isolados de *Azospirillum* foram inoculados em meio de cultura Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986). Os frascos foram colocados em incubador com agitação orbital de 120 rpm por seis dias a 28°C. A inoculação dos isolados nos vasos foi realizada seis dias após crescimento, com 5 mL de caldo de cultura contendo cerca de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. As plantas dos vasos que receberam os tratamentos com *Azospirillum* foram inoculadas com 5 mL do caldo de cada um dos três isolados e os tratamentos controle receberam 5 mL de meio de cultura esterilizado em autoclave.

Após 60 dias da semeadura, as plantas de milho foram cortadas, separando-se a parte da aérea do sistema radicular. Após secagem em estufa, em temperatura de até 65°C e peso constante, as amostras foram pesadas para quantificação da massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR) e trituradas para determinação do teor de N na MSPA, de acordo com Tedesco et al., (1995) e N total na MSPA.

Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (SILVA et al., 2009) e as médias comparadas pelo teste Duncan (p<0,05).

## Resultados e discussão

Pelo sequenciamento genético da região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo dos isolados utilizados neste estudo, o rizóbio UFRGS Vp16 foi identificado como pertencente à *Burkholderia* sp., com 100% de similaridade com o número de acesso

JN975051.1. Já as bactérias diazotróficas foram identificadas como pertencentes à *Azospirillum brasilense*, com 99% de similaridade do isolado UFRGS El-S com o número de acesso GU256438.1, 100% de similaridade do isolado UFRGS Lg1-R com o número de acesso FN813475.1 e 99% de similaridade do isolado UFRGS M-S com o número de acesso JF700491.1.

De acordo com a análise de variância (Tabela 1), verificou-se que as doses de nitrogênio, híbridos (H), inoculantes (I) e a interação entre estes fatores influenciaram significativamente as variáveis MSPA, MSSR e N na MSPA, com exceção da variável N na MSPA, que não foi influenciado pelo fator N, interação N x I e pela interação tripla entre os fatores; e a MSPA que não foi influenciada pela interação H x I e pela interação tripla.

A inoculação das bactérias diazotróficas nas plantas mostrou haver respostas na promoção de crescimento dependentes dos híbridos de milho. A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 promoveu o crescimento das plantas de todos os híbridos, exceto o híbrido de milho AS 1572. Já a inoculação combinada dos três isolados de *Azospirillum* (UFRGS El-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) não teve efeito na promoção de crescimento dos híbridos 30R50 e Fórmula (Tabela 2).

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 no híbrido de milho AS1572 não apresentou aumento na MSPA, MSSR e N na MSPA. Por outro lado, a inoculação dos isolados de *Azospirillum* no híbrido 30R50 não teve nenhum efeito na MSPA, MSSR e N na MSPA.

Apesar das diferenças de crescimento entre os híbridos, foi nas plantas do híbrido 30F53 que se obtiveram as maiores respostas à inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 e dos três isolados de *Azospirillum*, o que também pode ser visualizado na figura 1. No entanto, não foram observados estímulos em relação à produção de MSPA com a inoculação dos isolados de *Azospirillum* e do rizóbio UFRGS Vp16 nas plantas deste híbrido de milho que receberam N equivalente a 60 kg ha<sup>-1</sup>. Esse resultado, provavelmente, se deve ao baixo fornecimento de N às plantas. Porém, em comparação ao tratamento controle, a inoculação dos isolados de *Azospirillum* produziu aumentos de 16,2% na MSSR e de 56,7% no teor de N total na MSPA das plantas que receberam 60 kg ha<sup>-1</sup> de N. Já nas plantas que receberam 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, a inoculação com o rizóbio UFRGS Vp16 aumentou em 26,7% a MSSR e em 69,4% o teor

de N total na MSPA. Esses resultados comprovam a alta capacidade dos isolados de *Azospirillum* e do rizóbio UFRGS Vp16 em promover o crescimento de plantas de milho, a qual é bem documentada (FALLIK e OKON, 1996; HUNGRIA et al., 2010; JOE et al., 2012).

A bactéria UFRGS Vp16 foi isolada de nódulos de trevo branco (*Trifolium repens*) e mostrou capacidade de solubilizar fosfato tricálcico e fixação de N em trevo branco (ALVES, 2005). Essa bactéria pertence à espécie *Burkholderia* sp. pelo sequenciamento parcial do DNAr 16S com 100% de similaridade. Espécies de *Burkholderia* possuem grande capacidade de promoção de crescimento de plantas, como demonstrado para arroz (CHEN et al., 2005; GOVINDARAJAN et al., 2008), trigo (KENNEDY e ISLAM, 2001). Para a cultura do milho, há poucos trabalhos com inoculação de bactérias deste gênero (RIGGS et al., 2001; MIYAUCHI et al., 2008), apesar de ser frequentemente isolado da rizosfera ou de tecidos de plantas de milho (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; ARRUDA et al., 2013).

Nas plantas dos híbridos 30R50 e Fórmula não se observou promoção de crescimento pela inoculação combinada dos isolados de *Azospirillum*, assim como no híbrido AS 1572 com a inoculação do rizóbio UFRGS Vp16. Observou-se ainda que a inoculação da estirpe SEMIA 222, não promoveu o crescimento das plantas dos híbridos de milho. Pode-se inferir que as variações em tais resultados são devidas às interações entre híbridos de milho e bactérias promotoras de crescimento, as quais são dependentes dos genótipos da planta e dos microorganismos envolvidos. Em estudos com espécies de *Azospirillum* têm sido demonstrado o efeito do genótipo da planta na promoção de crescimento para trigo (*Triticum aestivum* L.) (CABALLERO-MELLADO et al., 1992), assim como milho (*Zea mays* L.) (GARCÍA de SALAMONE et al., 1996; MONTAÑEZ et al., 2009). Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Hebbbar et al., (1998) e Bevivino et al., (2000) não verificaram efeito de diferentes híbridos e cultivares de milho na promoção de crescimento com a inoculação de isolados de *Burkholderia cepacia*.

As respostas diferenciadas dos cinco híbridos de milho à inoculação dos rizóbios simbioses de leguminosas, SEMIA 222 e UFRGS Vp16, e da inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* sugere que para haver um efeito estimulante nas plantas é necessário haver um

reconhecimento no nível bioquímico entre as duas partes, e a interação bactéria/planta deve ser capaz de estabelecer populações bacterianas significativas na superfície radicular ou endofiticamente (ROTHBALLER et al., 2003), o que leva a deduzir que os micro-organismos podem ter um efeito significativo sobre a fisiologia da planta hospedeira. Sendo isso verdadeiro, uma consequência é que bactérias promotoras de crescimento podem diferir na capacidade de colonização das raízes e/ou tecidos internos (PEDRAZA et al., 2010; BHATTACHARJEE et al., 2012).

### Conclusões

A inoculação do rizóbio UFRGS Vp16 aumentou o crescimento dos híbridos de milho 30F53, NB 7205, 30R50 e Fórmula, porém não teve efeito de promoção de crescimento sobre o híbrido de milho AS 1572.

A inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* (UFRGS EL-S, UFRGS LG1-R e UFRGS M-S) aumentou o crescimento dos híbridos de milho 30F53, NB 7205 e AS 1572, porém nos híbridos 30R50 e Fórmula não teve efeito de promoção de crescimento pela inoculação com estas bactérias.

### Referências

ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.15-22, 2013.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR., W. T. Microbial biosynthesis of ethylene and its influence on plant growth. **Advances in Microbial Ecology**, v. 12, p. 69-111, 1992.

BATES, S. T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, v. 5, p. 908-917, 2011.

BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field

conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 4, 2011.

BEVIVINO, A. S. et al. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225-231, 2000.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 173-182, 2012.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N<sub>2</sub> fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied Environment Microbiology**, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

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.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 21-37, 2008.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between

- Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117-126, 2001.
- HEBBAR, K. P. et al. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 989-997, 1992.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413-425, 2010.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 2012. v. 25, n. 2, 88 p.
- JOE, M. M. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, 2012.
- KENNEDY, I. R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of symbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 447-457, 2001.
- MISHRA, R. P. N. et al. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in Rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v. 52, p. 383-389, 2006.
- MIYAUCHI, M. Y. H et al. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 525-531, 2008.
- MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253-263, 2009.
- OSÓRIO FILHO, B. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 126 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PEDRAZA, R. O. et al. Growth promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 265-272, 2010.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbiosis**, v. 35, p. 39-54, 2003. (Suppl. 1-3)
- RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 829-836, 2001.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* sp. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n.1-2, p.16, 1986.
- RÖESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p.1377-1383, 2007.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, v. 34, p. 261-279, 2003.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, v.1, n. 3, p. 231-234, 1975.
- SCHER, F. M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt Pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 1567-1573, 1982.
- SESSITSCH, A. et al. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 323-378, 2002.
- SILVA, F. A. S. E. ; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7., Reno. Reno: American

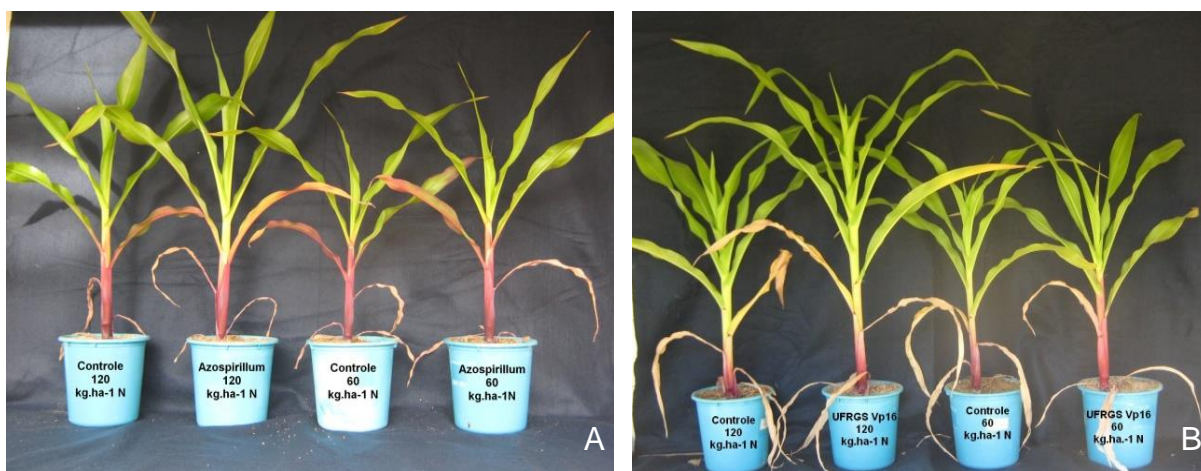
Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, v. 189, p. 494-506, 2011.

YANNI, Y. G; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* by *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant Soil**, v. 336, p. 129-142, 2010.



**Figura 1 - Plantas de milho do híbrido 30F53 inoculadas com bactérias diazotróficas. (A) plantas de milho inoculadas com isolados de *Azospirillum* (UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S) com doses equivalentes a 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N. (B) plantas de milho inoculadas com o rizóbio UFRGS Vp16 com doses equivalentes a 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N.**

**Tabela 1 - Resumo da análise de variância das variáveis Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Massa Seca do Sistema Radicular (MSSR) e Nitrogênio Total na Massa Seca da Parte Aérea (NMSPA) de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas em doses de nitrogênio.**

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios		
		MSPA	MSSR	NMSPA
Nitrogênio (N)	1	1017,6**	815,4**	312,2 ns
Híbridos (H)	4	137,1**	67,2**	37424,3**
Inoculantes (I)	3	16,4**	14,3**	10272,9**
N x H	3	16,5**	6,9**	1883,5**
N x I	3	4,6*	2,5**	275,1 ns
H x I	12	2,2 ns	4,1**	2010,7**
N x H x I	12	12,6 ns	0,9**	562,0 ns
Resíduo	117	1,2	0,1	404,6
CV (%)	159	10,1	3,8	11,9

\* - Efeito altamente significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade; \*\* - Efeito altamente significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade; ns – não significativo.

**Tabela 2 - Massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e nitrogênio total na massa seca da parte aérea de híbridos de milho inoculados com bactérias diazotróficas em doses equivalentes a 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.**

Nitrogênio (kg.ha <sup>-1</sup> )	--- 60 ---					--- 120 ---					
	Híbridos	30F53	NB 7205	30R50	AS 1572	Fórmula	30F53	NB 7205	30R50	AS 1572	Fórmula
Inoculantes	--- Massa seca da parte aérea (g) ---										
Controle	7,0 Ab	5,9 Ac	9,9 Aa	9,0 Aa	8,4 Aab	11,8 Ba	8,9 Ab	15,1 Ba	14,5 Aa	15,0 Aa	
<i>Azospirillum</i>	9,0 Aa	6,0 Ab	10,3 Aa	10,3 Aa	9,2 Aa	13,2 ABab	9,0 Ac	14,9 Ba	14,4 Aa	16,1 Aa	
SEMIA 222	7,8 Ab	5,8 Ac	9,5 Aa	9,4 Aa	8,9 Aa	11,8 Bb	8,9 Ac	14,8 Ba	14,7 Aa	15,9 Aa	
UFRGS Vp16	8,7 Ab	6,6 Ac	10,4 Aa	9,6 Aa	9,1 Aa	16,2 Aa	9,8 Ac	17,2 Aa	13,0 Ab	16,6 Aa	
	--- Massa seca do sistema radicular (g) ---										
Controle	6,0 Bb	4,9 Bc	7,2 Aa	8,0 Aa	7,0 Aab	8,7 Bb	8,7 Ab	11,7 Bab	12,9 Aa	12,0 Ba	
<i>Azospirillum</i>	7,0 Ab	6,4 Ac	7,0 Ab	9,0 Aa	7,8 Aab	10,6 Ab	9,5 Ac	11,7 Bab	13,4 Aa	13,8 Ba	
SEMIA 222	6,2 Bb	4,9 Bc	8,2 Aa	7,8 Aa	7,7 Aa	9,2 Bb	8,3 Ab	11,1 Ba	11,6 Aa	12,7 Ba	
UFRGS Vp16	7,6 Aab	5,6 ABb	8,4 Aa	8,1 Aa	8,0 Aa	11,1 Ab	9,9 Ac	14,4 Aa	12,7 Aab	15,6 Aa	
	--- Nitrogênio total na massa seca da parte aérea (mg) ---										
Controle	70,5 Bb	73,6 Ab	113,8 ABa	120,5 Ba	94,6 Aab	193,2 Cbc	169,6 Bc	298,9 Aa	323,0 Aa	263,9 Bb	
<i>Azospirillum</i>	110,5 Aab	79,7 Ab	116,2 Aa	158,2 Aa	113,8 Aa	259,2 Bbc	174,8 ABc	299,3 Aab	337,6 Aa	272,6 Bb	
SEMIA 222	81,9 Bb	77,2 Ab	106,4 Bab	124,1 Ba	96,0 Ab	203,0 Cc	173,2 Bc	298,5 Aab	323,4 Aa	273,4 Bb	
UFRGS Vp16	117,5 Aab	89,9 Ab	131,6 Aa	123,0 Ba	102,7 Aa	327,2 Aa	199,8 Ab	338,4 Aa	326,4 Aa	345,4 Aa	

Médias de tratamentos em cada dose de nitrogênio, seguidas de letra igual minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si (Duncan<0,05).