

Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense* e nitrogênio

A rizobactéria *Azospirillum brasilense* vem sendo utilizada para fins agrícolas como insumo biológico com potencial para reduzir os custos econômicos e ambientais derivados do uso intensivo de fertilizantes nitrogenados de origem industrial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento do milho AL Bandeirante considerando a aplicação ou não de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas em solo com adição ou não de nitrogênio por ocasião da semeadura. O experimento foi realizado em casa de vegetação, no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2, com 6 repetições. As variáveis avaliadas foram altura da planta, diâmetro basal do colmo, nitrogênio acumulado na parte aérea e as massas das folhas, do colmo, da parte aérea, da raiz e total. A adubação nitrogenada na semeadura contribuiu para incrementar o crescimento do milho. A inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas apresentou resposta similar ao adubo nitrogenado para o crescimento das plantas. A forma de aplicação da rizobactéria não produziu efeito diferenciado na massa total e/ou no nitrogênio acumulado na parte aérea do milho.

Palavras-chave: *Zea mays*; Inoculação; Bactérias diazotróficas; RPCPs.

Maize growth in response to *Azospirillum brasilense* and nitrogen

Rhizobacteria *Azospirillum brasilense* has been used for agricultural purposes as a biological source with potential to reduce economic and environmental costs derived from the intensive use of industrial nitrogen fertilizers. The objective of this work was to evaluate the growth of maize variety 'AL Bandeirante' considering the application or not of *Azospirillum brasilense* inoculant in seeds and/or leaves in soil with or without nitrogen addition at sowing. The experiment was carried out in a greenhouse, in a completely randomized design in a 2 x 2 x 2 factorial scheme, with 6 replications. The variables evaluated were plant height, basal stem diameter, accumulated nitrogen accumulated in the shoot and dry mass of leaf, stem, shoot, root and total. Nitrogen fertilization at sowing contributed to increase maize growth. Inoculation of *Azospirillum brasilense* in seeds and/or leaves showed similar response to nitrogen fertilizer for plant growth. The application method of rhizobacteria did not produce differentiated effect on the total mass and/or in nitrogen accumulated in the shoots of maize.

Keywords: *Zea mays*; Inoculation; Diazotrophic bacteria; PGPRs.

Topic: **Desenvolvimento, Sustentabilidade e Meio Ambiente**

Received: **10/08/2019**

Approved: **28/09/2019**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Andréia de Lima Moreno

Universidade Federal do Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4252988221826496>

andreiatantalo.lider@gmail.com

Jorge Ferreira Kusdra 

Universidade Federal do Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1089099197793431>

<http://orcid.org/0000-0003-3651-468X>

kusdra@globo.com

Angelita Aparecida Coutinho Picazevicz 

Instituto Federal de Rondônia, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/9808078161906025>

<http://orcid.org/0000-0001-9570-2942>

angelitaacoutinho@gmail.com



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2019.005.0025

Referencing this:

MORENO, A. L.; KUSDRA, J. F.; PICAZEVICZ, A. A. C. Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense* e nitrogênio. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.5, p.287-294, 2019. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.005.0025>

INTRODUÇÃO

O cultivo do milho é altamente dependente de nitrogênio e os solos brasileiros não suprem adequadamente a demanda das plantas por este nutriente, razão pela qual os adubos químicos nitrogenados são utilizados para esta finalidade. Porém, problemas relacionados a baixa eficiência de aproveitamento deste nutriente pelas plantas, ao alto custo deste insumo e aos riscos de poluição ambiental decorrentes de sua utilização, têm sido considerados na busca por alternativas que viabilizem a redução da quantidade aplicada e/ou potencializem seu efeito no aumento do crescimento e da produção do milho.

O milho é uma Poaceae que pode beneficiar-se da associação com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico como *Azospirillum brasilense* que normalmente colonizam seu sistema radicular e, por este motivo, a utilização de inoculantes biológicos comerciais à base deste microrganismo diazotrófico pode viabilizar a disponibilização biológica do elemento para as plantas. Neste sentido, a inoculação das sementes e/ou das folhas com *Azospirillum brasilense*, combinada ao uso de nitrogênio por ocasião da semeadura, em que são normalmente aplicadas doses deste elemento ao solo variando de 24 kg ha⁻¹ a 90 kg ha⁻¹, pode contribuir para reduzir ou até mesmo evitar a necessidade de adubação em cobertura que demanda maior quantidade deste insumo como já verificado por Dartora et al. (2016), Garcia et al. (2017), Hungria et al. (2010) e Mumbach et al. (2017).

A fixação biológica do nitrogênio por *Azospirillum brasilense* em associação com poáceas supre parcialmente as necessidades das plantas por este nutriente (PICCININ et al., 2015). Todavia, benefícios adicionais podem ser derivados deste microrganismo pelo fato de atuar também como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCPs) por meio da síntese de fitormônios como a auxina que estimula o alongamento da parte aérea e radicular de várias poáceas (CASTILLO et al., 2015). Há ainda indicativos de que esta espécie contribua para melhorar a absorção de água e minerais, reduzir fatores de estresse ambiental e controlar fitopatógenos (BASHAN et al., 2010).

Produtos biológicos específicos para a cultura do milho à base de *Azospirillum brasilense*, contendo as estirpes AbV5 e/ou AbV6, apresentados em formulação turfosa ou líquida, são normalmente aplicados nas sementes (HUNGRIA, 2011). Contudo, a inoculação foliar deste microrganismo tem sido considerada visando ampliar seus benefícios para a planta uma vez que estresses relativos à sua adaptação no solo tais como temperatura, umidade e competição com microrganismos nativos, além do contato direto com os defensivos químicos utilizados no tratamento das sementes, contribuem para reduzir a população bacteriana e, conseqüentemente, comprometer a eficiência das mesmas em promover o crescimento das plantas (DOMINGUES NETO et al., 2013; KAPPES et al., 2017; SANTINI et al., 2018).

A aplicação de inoculantes contendo *Azospirillum brasilense*, associado ou não à adubação nitrogenada, vem sendo utilizada para melhorar o desempenho agrônômico do milho e resultados positivos derivados da inoculação desta rizobactéria têm sido verificados constatando-se aumento da produção, incrementos na massa seca e maior acúmulo de nitrogênio nas plantas (COSTA et al., 2015; KAPPES et al., 2013; LANA et al., 2012; MARINI et al., 2015; NOVAKOWISKI et al., 2011; PEREIRA et al., 2015). Neste sentido,

o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento do milho AL Bandeirante sob efeito da aplicação da rizobactéria nas sementes e/ou folhas combinada ou não com a adição do adubo nitrogenado no solo por ocasião da semeadura.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de fevereiro a abril de 2017 foi realizado um experimento em casa de vegetação, localizada na área experimental da Universidade Federal do Acre, em Rio Branco, Acre, utilizando-se como planta teste o milho variedade AL Bandeirante, no delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$, com 6 repetições, considerando-se como fatores *Azospirillum brasilense* e nitrogênio, com dois níveis sendo, aplicação ou não das bactérias nas sementes e/ou nas folhas e adição ou não de nitrogênio ao solo. As unidades experimentais foram constituídas por tubos de PVC branco, com diâmetro de 200 mm, altura de 50 cm e capacidade volumétrica de $15,7 \text{ dm}^3$, contendo como substrato solo coletado dos 20 cm superficiais de uma área experimental em pousio. Após sua coleta, verificou-se com base em análise química a necessidade de se realizar calagem para elevar a saturação de bases de 28,9% para a faixa de 60%. Considerando a condição de trabalho em tubos, sete dias antes da implantação do experimento, elevou-se o nível de fertilidade do substrato mediante adubação fosfatada com 100 mg de P na forma de superfosfato simples (18% de P_2O_5) e potássica com 100 mg de K na forma de cloreto de potássio (60% de K_2O).

As características químicas do solo apresentadas antes da instalação do experimento foram: pH em $\text{CaCl}_2 = 5,1$; matéria orgânica = $39,0 \text{ g dm}^{-3}$; P = $27,0 \text{ mg dm}^{-3}$; K = $198,9 \text{ mg dm}^{-3}$; Ca = $4,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Mg = $0,9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Al = $0,1 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; H+Al = $3,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; soma de bases = $6,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; CTC = $9,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; saturação por bases = 61,2%. A análise granulométrica do solo indicou que este apresentava 427 g kg^{-1} de argila, 227 g kg^{-1} de silte e 346 g kg^{-1} de areia sendo, portanto, de textura argilosa.

A fonte de *Azospirillum brasilense* utilizada nas sementes foi inoculante comercial turfoso contendo as estirpes AbV5 e AbV6 apresentando cerca de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) da bactéria por g do produto. O número mais provável (NMP) de UFC foi estimado pelo método de diluição seriada e contagem de colônias em placas com meio seletivo para *Azospirillum brasilense* composto de ácido málico (5 g), fosfato dipotássico (0,5 g), sulfatos de ferro (0,5 g), manganês (0,01 g) e magnésio (0,2 g), cloretos de sódio (0,1 g) e de cálcio (0,02 g), molibdato de sódio (0,002 g), azul de bromotimol (0,002 g), ágar (20 g), hidróxido de potássio (4 g) e água destilada (1 L). A dose do produto biológico adicionada por kg de sementes correspondeu a 5 g e, visando garantir distribuição uniforme e maior adesão do inoculante às sementes, estas foram umedecidas com solução açucarada a 10% na dosagem de 12 mL kg^{-1} de semente.

O produto comercial de formulação líquida à base de *Azospirillum brasilense* contendo a estirpe AbV5 foi utilizado para aplicação foliar e igualmente avaliado quanto à sua qualidade se seguindo o mesmo procedimento adotado para verificação do NMP de UFC presente no inoculante turfoso. A quantidade estimada de UFC do microrganismo foi de $5,7 \times 10^8$ por mL do produto sendo esta concentração também estabelecida como dose aplicada nas folhas.

O nitrogênio na forma de ureia (46% N) foi adicionado ao solo no momento da instalação do

experimento em quantidade equivalente a 30 kg ha⁻¹. Posteriormente, o inoculante turfoso foi aplicado e misturado homogeneamente nas sementes e após sua secagem à sombra efetuou-se a semeadura de cinco destas por unidade experimental em profundidade padrão de 3 cm e de forma equidistante. O desbaste foi realizado no estágio fenológico V3, mantendo-se apenas a planta considerada mais vigorosa por unidade experimental.

Quando as plantas de milho atingiram o estágio fenológico V4, procedeu-se a aplicação do *Azospirillum brasilense* nas folhas nos tratamentos para os quais foi definida a sua presença. O produto foi aplicado utilizando-se um borrifador manual com vazão aproximada de 0,17 mL. Desta forma, como a intenção era a de adicionar 1 mL do inoculante, foram efetuadas 6 borrifadas do mesmo por planta. No momento da aplicação as plantas foram acondicionadas em uma câmara de PVC com diâmetro de 200 mm e altura de 50 cm, similar à utilizada como unidade experimental, visando individualizar a aplicação do produto bem como evitar a dissipação do mesmo pelo vento, viabilizar sua adesão e promover distribuição homogênea nas folhas.

As irrigações foram efetuadas regularmente e de forma homogênea, sendo utilizada como referência de umidade, 75% da capacidade de campo. As condições de temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas com datalogger instalado no interior da casa de vegetação e as respectivas médias obtidas foram de 29,1 °C e 79,2%.

Quando o milho atingiu o estágio VT efetuaram-se as avaliações das variáveis de crescimento. A altura das plantas foi obtida por medição destas do colo ao limite do pendão. O diâmetro do colmo foi medido com paquímetro na região basal. Para obtenção das massas secas, a parte aérea (folhas, colmo, pendão) e radicular foram mantidas em estufa a 65 °C até verificação de valores constantes. Também se efetuou a quantificação do nitrogênio acumulado na parte aérea da planta por digestão úmida de acordo com o método semi micro Kjeldahl descrito por Tedesco et al. (1995).

Os procedimentos relacionados à análise estatística dos resultados das variáveis consistiram na verificação inicial da presença de dados discrepantes (GRUBBS, 1969), normalidade dos erros (SHAPIRO et al., 1965) e homogeneidade das variâncias (BARTLETT, 1937). Os efeitos isolados e/ou combinados de *Azospirillum brasilense* (sementes e/ou folhas) e nitrogênio no solo, assim como o desdobramento de suas interações quando significativas ($p < 0,05$) foram avaliados pelo teste F de Snedecor et al. (1948). Efetuou-se ainda, por meio de contrastes ortogonais (NOGUEIRA, 2004), a comparação entre a ausência e presença de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas considerando a aplicação ou não de nitrogênio ao solo. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adubação nitrogenada do solo resultou em aumento das massas do colmo (11,1%), da parte aérea (13,3%) e total da planta (11,3%), assim como para a quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea do milho (13,0%) conforme apresentado na Tabela 1. A obtenção desta resposta evidencia a importância do nitrogênio para a cultura indicando que é essencial a disponibilização do mesmo já nos primeiros estágios de

desenvolvimento das plantas assim como foi verificado por Andrade et al. (2014), Biesdorf et al. (2016), Morais et al. (2015) e Dantas et al. (2014). No caso do presente trabalho a aplicação deste nutriente na semeadura, em dose equivalente a 30 kg ha⁻¹, foi suficiente para proporcionar crescimento vegetativo do milho superior ao observado quando não se efetuou a fertilização nitrogenada do solo. Efeito similar para as massas (colmo, parte aérea e total) derivado da adubação também foi obtido por Picazevicz (2017) mediante utilização da mesma fonte (ureia) e dose de nitrogênio (30 kg ha⁻¹) consideradas no presente experimento.

Tabela 1: Efeito do nitrogênio nas massas do colmo, da parte aérea e total da planta seca (MCS, MPAS e MTPS) e do nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante

Nitrogênio	MCS	MPAS	MTPS	NAPA
	g			mg
Ausência	40,09 b	78,60 b	90,64 b	1367,07 b
Presença	44,55 a	89,06 a	100,88 a	1545,24 a
CV (%)	17,22	16,55	16,72	19,23

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p>0,05$) entre si pelo teste F.

Respostas positivas ou negativas para as variáveis avaliadas (altura da planta, diâmetro basal do colmo, nitrogênio acumulado na parte aérea e as massas das folhas, do colmo, da parte aérea, da raiz e total) não foram verificadas quando a inoculação de *Azospirillum brasilense* foi efetuada nas sementes e/ou folhas. Embora a expectativa fosse que rizobactéria intensificasse o crescimento das plantas os resultados obtidos não evidenciaram a produção de efeitos significativos proporcionados pelo seu uso ou forma de aplicação desta. Kappes et al. (2017) e Santini et al. (2018) também não verificaram respostas para o crescimento do milho ou quanto ao acúmulo de nitrogênio no mesmo em função do uso do microrganismo independentemente do método de inoculação (sementes e/ou folhas).

Ainda que não tenha sido observada, mediante análise do arranjo fatorial, contribuição para as plantas vinculadas à presença de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas, verificou-se, por contrastes ortogonais, que esta espécie de rizobactéria apresenta potencial para melhorar as características agronômicas da cultura seja pela sua ação como microrganismo diazotrófico ou em função de atuar na solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e produção de metabólitos com propriedade fungicida e/ou bactericida. Considerou-se a massa total, representativa do crescimento global da planta, e a quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea para avaliar a magnitude do efeito produzido por *Azospirillum brasilense* no milho.

Em solo sem a adição de fertilizante nitrogenado, o uso de *Azospirillum brasilense* não interferiu no incremento da massa total das plantas quando este foi aplicado nas sementes, nas folhas ou em ambos. Foi verificado, no entanto, para o nitrogênio acumulado na parte aérea, que ao ser inoculado nas sementes o microrganismo contribuiu para aumentar a quantidade deste macronutriente nas plantas (Tabela 2). Picazevicz et al. (2017) obtiveram incremento (29,6%) similar ao observado neste experimento (31,3%) considerando a mesma forma de inoculação da bactéria e sem adição de nitrogênio no substrato de cultivo.

Quando o solo com adubação nitrogenada foi utilizado como referencial de comparação para avaliar a eficiência da rizobactéria, foi possível perceber que a mesma tem potencial para produzir respostas de crescimento para as plantas, independente da forma de inoculação, sendo estas similares às observadas

em função do uso de fertilizante (Tabela 3). Este resultado evidencia que inoculantes biológicos à base de *Azospirillum brasilense* podem ser alternativa aos insumos químicos normalmente utilizados para disponibilização de nutrientes para as plantas, especialmente o nitrogênio. Além de contribuir para a disponibilização deste nutriente via fixação biológica, a rizobactéria pode ainda melhorar o aproveitamento de outros nutrientes mediante a produção de substâncias solubilizadoras, ampliar o potencial de absorção radicular e estimular o crescimento da planta pela síntese de fitormônios.

Tabela 2: Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), considerando sua forma de aplicação, sem adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
Com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas sementes	94,60 a	1557,35 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	81,23 a	1186,36 b
Com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas folhas	90,72 a	1435,28 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	81,23 a	1186,36 a
Com inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e folhas	96,01 a	1289,27 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	81,23 a	1186,36 a
CV (%)	16,72	19,23

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p>0,05$) entre si pelo teste F.

Tabela 3: Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), independente de sua forma de aplicação, com ou sem adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
Sem adubação nitrogenada e com inoculação de <i>Ab</i>	93,77 a	1427,30 a
Com adubação nitrogenada e sem inoculação de <i>Ab</i>	94,71 a	1583,80 a
CV (%)	16,72	19,23

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p>0,05$) entre si pelo teste F.

A inoculação de *Azospirillum brasilense* tem se mostrado eficiente em potencializar o efeito da adubação nitrogenada e, neste sentido, tem contribuído para dispensar a necessidade da aplicação de doses maiores que $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de nitrogênio por ocasião da semeadura do milho (DARTORA et al., 2016; GARCIA et al., 2017; MUMBACH et al., 2017). Assim, esperava-se neste experimento que, mediante a aplicação combinada da rizobactéria nas sementes e/ou folhas com o adubo nitrogenado adicionado ao solo, fosse produzida resposta de crescimento para as plantas superior a observada somente com o uso de $30 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de nitrogênio. Porém, esta situação não se confirmou uma vez que a massa total da planta e o nitrogênio acumulado nesta apresentaram ambas desempenho similar derivado da inoculação e não da rizobactéria na presença do fertilizante nitrogenado (Tabela 4). Portanto, neste caso, o uso simultâneo de fontes biológicas e químicas não produziu resultados superiores aos obtidos individualmente.

Tabela 4: Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*) considerando sua forma de aplicação com adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
Com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas sementes	104,93 a	1551,10 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
Com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas folhas	104,42 a	1533,22 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
Com inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e folhas	99,46 a	1512,91 a
Sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
CV (%)	16,72	19,23

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem ($p>0,05$) entre si pelo teste F.

A inoculação de *Azospirillum brasilense* nas folhas tem apresentado respostas pouco expressivas para o milho (KAPPES et al., 2017; SANTINI et al., 2018) provavelmente porque estas parecem ser mais eficientes em colonizar o sistema radicular desta espécie vegetal do que sua parte aérea. Como estas ocorrem naturalmente no solo colonizando raízes de poáceas a indução de efeitos a partir de outra estrutura vegetal pode representar desgaste energético para seu estabelecimento o que contribui para reduzir sua população e, com isso, minimizar a produção de respostas de crescimento para as plantas. No entanto, neste experimento não foi observada diferença ($p > 0,05$) quanto a forma de aplicação da rizobactéria uma vez que a inoculação destas nas sementes ou nas folhas resultou em respostas similares para as variáveis avaliadas. Porém, considerando o custo operacional de aplicação do produto biológico é recomendável que este seja aplicado nas sementes e não nas folhas.

CONCLUSÕES

A adubação nitrogenada do solo em dose correspondente à 30 kg ha⁻¹ na semeadura aumenta o crescimento das plantas e o acúmulo de nitrogênio no milho AL Bandeirante. A inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes incrementa a quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea do milho AL Bandeirante quando não se efetua a adubação nitrogenada do solo.

Independentemente de ser aplicada nas sementes e/ou via foliar o efeito produzido por *Azospirillum brasilense* na massa total e no nitrogênio acumulado na parte aérea do milho AL Bandeirante é similar ao que se obtém com a adição do fertilizante nitrogenado no solo e equivalente ao observado quando a rizobactéria é inoculada nas sementes ou nas folhas. A aplicação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou nas folhas não potencializa o efeito da adubação nitrogenada no crescimento do milho AL Bandeirante.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. R.; PETTER, F. A.; NÓBREGA, J. C. A.; PACHECO, L. P.; ZUFFO, A. M. Desempenho agrônomico do milho a doses e épocas de aplicação de nitrogênio no Cerrado piauiense. *Revista de Ciências Agrárias*, v.57, n.4, p.358-366, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rca.1295>
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London*, v.160, n.901, p.268-282, 1937. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: a critical assessment. *Advances in Agronomy*, v.108, n.1, p.77-136, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- BIESDORF, E. M.; BIESDORF, E. M.; TEIXEIRA, M. F. F.; DIETRICH, O. H.; PIMENTEL, L. D.; ARAUJO, C. Métodos de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em solo de cerrado. *Revista de Agricultura Neotropical*, v.3, n.1, p.44-50, 2016. DOI: <https://doi.org/10.32404/rean.v3i1.805>
- CASTILLO, P.; MOLINA, R.; ANDRADE, A.; VIGLIOCCO, A.; ALEMANO, S.; CASSÁN, F. D. Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: the genus *Azospirillum*. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p.115-138.
- COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. S. F.; NAVES, D. C. F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.45, n.3, p.304-311, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4534593>
- DANTAS, D. F. S.; OLIVEIRA, A. P.; BANDEIRA, N. V. S.; PINHEIRO, S. M. G.; DANTAS, T. A. G.; SILVA, O. P. R. Produtividade de espigas e grãos verde de milho adubado com fontes e doses de nitrogênio. *Revista Agropecuária Técnica*, v.35, n.1, p.100-105, 2014. DOI: <https://doi.org/10.25066/agrotec.v35i1.18967>
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MENEZES, C. R. J.; FREIBERGER, M. B.; CASTOLDI, G.; GONÇALVES, E. D. V. Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bacteria. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.20, n.7, p.606-611, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n7p606-611>
- DOMINGUES NETO, F. J.; YOSHIMI, F. K.; GARCIA, R. D.; MIYAMOTO, Y. R.; DOMINGUES, M. C. S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à

aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p.1-11, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

GARCIA, M. M.; PEREIRA, L. C.; BRACCINI, A. L.; ANGELOTTI, P.; SUZUKAWA, A. K.; MARTELI, D. C. V.; FELBER, P. H.; BIANCHETTI, P. A.; DAMETTO, I. B. Effects of *Azospirillum brasilense* on growth and yield compounds of maize grown at nitrogen limiting conditions. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, n.2, p.353-362, 2017. DOI: <https://doi.org/10.19084/RCA16101>

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, n.1, p.1-21, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490657>

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1, p.413-425, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; DAL BEM, E. A.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.527-538, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p527>

KAPPES, C.; SILVA, R. G.; FERREIRA, V. E. N. Aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura no milho safrinha. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.16, n.3, p.366-373, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n3p366-373>

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v.59, n.3, p.399-405, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300016>

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. do C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v.62, n.1, p.117-123, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562010015>

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H.; FERREIRA, A. S.; LUZ, J. M. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**, v.62, n.6, p.589-596, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562060012>

MUMBACH, G. L.; KOTOWSKI, I. E.; SCHNEIDER, F. J. A.; MALLMANN, M. S.; BONFADA, E. B.; PORTELA, V. O.; BONFADA, E. B.; KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Scientia Agraria**, v.18, n.2, p.97-103, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i2.51475>

NOGUEIRA, M. C. S. Orthogonal contrasts: definitions and concepts. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, p.118-124, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000100020>

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p.1687-1698, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4Sup1p1687>

PEREIRA, L. M.; PEREIRA, E. M.; REVOLTI, L. T. M.; ZINGARETTI, S. M.; MÔRO, G. V. Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.3, p.630-637, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150047>

PICAZEVICZ, A. A. C. **Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molibdênio e nitrogênio**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2017.

PICAZEVICZ, A. A. C.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. L. Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.21, n.9, p.623-627, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n9p623-627>

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; SUZUKAWA, A. K.; DAN, L. G. M.; GODINHO, F. B. Agronomic performance of maize in response to seed inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen doses and bioregulator. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.13, n.3-4, p.67-73, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.2018044>

SANTINI, J. M. K.; BUZETTI, S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GALINDO, F. S.; COAGUILA, D. N.; BOLETA, E. H. M. Doses and forms of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize crop. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.22, n.6, p.373-377, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n6p373-377>

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v.52, n.3-4, p.591-611, 1965. DOI: <https://doi.org/10.2307/2333709>

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1948.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BISSANI, A. C.; BOHLEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: UFRS, 1995.

A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detém os direitos materiais desta publicação. Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas sob coordenação da **Sustenere Publishing**, da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.