

Manejo de nitrogênio e modo de aplicação de *Azospirillum brasilense* em milho

Nitrogen management and application of *Azospirillum brasilense* in corn

Manejo de nitrógeno y aplicación de *Azospirillum brasilense* en maíz

Recebido: 18/06/2020 | Revisado: 01/07/2020 | Aceito: 04/07/2020 | Publicado: 16/07/2020

Lucymara Merquides Contardi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5418-5077>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: lu_contardi@hotmail.com

Rita de Cássia Félix Alvarez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1655-9939>

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: rita.alvarez@ufms.br

Sebastião Ferreira de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5693-912X>

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: sebastiao.lima@ufms.br

Vespasiano Borges de Paiva Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3347-7043>

Universidade Federal do Vale do São Francisco

E-mail: Vespasiano.paiva@univasf.edu.br

Marivaine da Silva Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4050-4599>

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: marivaine.brasil@ufms.br

Roberta de Vasconcelos Ramires

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2192-5849>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

E-mail: roberta.vasconcelos@ufvjm.edu.br

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de *Azospirillum brasilense* aplicado em sementes e no sulco de semeadura, associado ao uso de nitrogênio em semeadura e cobertura sobre a

cultura do milho. O experimento utilizou o delineamento experimental em blocos casualizados, com 19 tratamentos e quatro repetições, constituindo-se de modos de aplicação de *A. brasilense* (sementes e sulco de plantio) associado à adubação nitrogenada de semeadura e cobertura. Foram avaliados o número de espiga por planta, a massa de grãos por espiga, a massa de cem grãos, a produtividade de grãos, o teor de nitrogênio total e a quantificação das bactérias diazotróficas. A aplicação da dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ do inoculante no sulco de plantio associado a 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionaram a maior produtividade de grãos. A produtividade de grãos de milho, a massa de cem grãos e o teor de N nos grãos são beneficiados pelo uso da bactéria, aplicada nas sementes ou no sulco de cultivo, no entanto, não substitui a aplicação de nitrogênio, para se atingir altas produtividades. A inoculação de sementes na presença de adubação nitrogenada promoveu maior população de bactérias diazotróficas por grama de raiz. A quantidade de *Azospirillum* sp. por grama de massa fresca de raiz não está correlacionada a produtividade de grãos.

Palavras-chave: *Zea mays*; Adubação nitrogenada; Bactérias diazotróficas; Promotores de crescimento.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the use of *Azospirillum brasilense* applied in seeds and in the sowing furrow, associated with the use of nitrogen in sowing and cover over the corn crop. The experiment used a randomized block design, with 19 treatments and four repetitions, constituting application modes of *A. brasilense* (seeds and planting furrow) associated with nitrogen fertilization of sowing and cover. The number of ears per plant, the mass of grains per ear, the mass of one hundred grains, the grain yield, the total nitrogen content and the quantification of diazotrophic bacteria were evaluated. The application of the 300 mL p.c. ha⁻¹ of the inoculant in the planting furrow associated with 20 kg ha⁻¹ of N at sowing and 120 kg ha⁻¹ of N in cover provided the highest grain yield. The productivity of corn grains, the mass of one hundred grains and the N content in the grains are benefited by the use of the bacterium, applied in the seeds or in the cultivation furrow, however, it does not substitute the application of nitrogen, in order to reach high productivity. Seed inoculation in the presence of nitrogen fertilization promoted a greater population of diazotrophic bacteria per gram of root. The amount of *Azospirillum* sp. per gram of fresh root mass is not correlated with grain yield.

Keywords: *Zea mays*; Nitrogen fertilization; Diazotrophic bacteria; Growth promoters.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de *Azospirillum brasilense* aplicado en semillas y en el surco de siembra, asociado con el uso de nitrógeno en la siembra y cobertura sobre el cultivo de maíz. El experimento utilizó un diseño de bloques al azar, con 19 tratamientos y cuatro repeticiones, que constituyen modos de aplicación de *A. brasilense* (semillas y surcos de siembra) asociados con la fertilización nitrogenada de la siembra y la cubierta. Se evaluó el número de mazorcas por planta, la masa de granos por mazorca, la masa de cien granos, el rendimiento de grano, el contenido total de nitrógeno y la cuantificación de bacterias diazotróficas. La aplicación de 300 ml p.c. ha⁻¹ del inoculante en el surco de siembra asociado con 20 kg ha⁻¹ de N en la siembra y 120 kg ha⁻¹ de N en cubierta proporcionaron el mayor rendimiento de grano. La productividad de los granos de maíz, la masa de cien granos y el contenido de N en los granos se ven beneficiados por el uso de la bacteria, aplicada en las semillas o en el surco de cultivo, sin embargo, no sustituye la aplicación de nitrógeno, para alcanzar una alta productividad. La inoculación de semillas en presencia de fertilización nitrogenada promovió una mayor población de bacterias diazotróficas por gramo de raíz. La cantidad de *Azospirillum* sp. por gramo de masa de raíz fresca no está correlacionado con el rendimiento de grano.

Palabras clave: *Zea mays*; Fertilización nitrogenada; Bacterias diazotróficas; Promotores de crecimiento.

1. Introdução

O suprimento inadequado de nitrogênio na cultura do milho é considerado como um fator de interferência no crescimento das plantas e rendimento dos grãos (Silva, Silva & Libadi, 2013), além de onerar os custos de produção, já que a fonte nitrogenada predominantemente utilizada hoje na agricultura tem origem sintética, com altos custos para obtenção e também causadora de riscos ambientais, quando utilizado de forma inadequada. De acordo com Hungria (2011), o Brasil importa 73% do N utilizado na agricultura.

Apesar das inovações tecnológicas que surgem a cada ano agrícola, a adubação nitrogenada ainda é um dos principais limitantes para o alcance da máxima produtividade da cultura do milho (Morais, 2012). Assim, considerando todos os possíveis impactos do uso do nitrogênio, aliado ao aumento da demanda por alimentos, reforça-se a necessidade de incorporar práticas sustentáveis de produção, como a racionalização do uso de fertilizantes nitrogenados (Dartora et al., 2013).

Uma das alternativas para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados de produção industrial na cultura do milho é o aproveitamento do processo natural de fixação biológica do nitrogênio, realizada por um grupo de bactérias, denominadas diazotróficas (Kappes et al., 2013). Dentre as bactérias diazotróficas, as do gênero *Azospirillum*, principalmente a espécie *A. brasilense* tem sido usada como inoculante em diversas culturas (Reis, 2007). Especificamente para o milho, *A. brasilense* vem proporcionando resultados positivos, como incremento nos componentes de produção e produtividade de grãos (Baldani & Baldani, 2005; Moreira, Valadão & Valadão Júnior, 2019). O método mais comum utilizado para a aplicação do inoculante é via sementes. No entanto, a inoculação via sulco de semeadura pode constituir uma forma de evitar a toxidez dos produtos utilizados no tratamento de sementes sobre a bactéria, que podem desestruturar o flagelo usado pela *A. brasilense* na associação com a planta (Croes et al., 1993).

De toda forma, os resultados de pesquisa com o uso de bactérias diazotróficas na cultura do milho não tem sido padronizada, sendo encontrado uma diversidade de resultados relacionados ao uso de *A. brasilense*, seja a inoculação via sementes ou sulco de plantio com ganhos em rendimento (Müller et al., 2016) ou em caracteres agronômicos (Oliveira et al., 2018) ou a possibilidade da redução das dosagens de N aplicadas (Alvarez et al., 2019). Resultados negativos também foram observados, onde a inoculação com *A. brasilense* via semente, proporcionou menor população final de plantas, altura de plantas e a massa de mil grãos de milho (Portugal et al., 2017).

A utilização de *A. brasilense* no milho tem potencial para permitir o manejo mais adequado do nitrogênio, resultando em ganhos para a cultura, e apesar dos vários resultados já obtidos, as respostas ainda são controversas, permitindo a elaboração de diversas pesquisas nesse sentido. Assim, objetivou-se nesse trabalho avaliar o uso de *A. brasilense* aplicado em sementes e no sulco, associado ao uso de nitrogênio em semeadura e cobertura, sobre a cultura do milho.

2. Metodologia

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa experimental desenvolvida em condições de campo e de natureza qualitativa e quantitativa e aplicou métodos estatísticos para a avaliação dos dados, seguindo os preceitos fundamentais deste tipo de pesquisa (Pereira et al., 2018).

O experimento foi conduzido em Chapadão do Sul- MS, localizado nas coordenadas 18° 46'17,8" de latitude sul, 52° 37'27,7" de longitude oeste e com altitude de 813 m. O clima da região, segundo Köppen é do tipo tropical úmido (Aw), com estação chuvosa no verão e seca no inverno e precipitação média anual de 1.850 mm, com temperatura média anual variando de 13°C a 28°C (Cunha, Magalhães & Castro, 2013).

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico argiloso (Santos et al., 2018), onde foram coletadas amostras para análise química, segundo método proposto por Raij et al. (2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental na camada de 0,0 – 0,20 m, Chapadão do Sul, MS.

pH	M.O	P	H+Al	K	Ca	Mg	CTC	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	cmolc dm ⁻³			(pH 7,0)	%	
4,7	29,5	11,6	5,3	0,26	2,3	0,5	8,4	36,6

Fonte: Autores.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 19 tratamentos e quatro repetições, compostos da combinação entre formas de inoculação de *A. brasilense* associado a adubação nitrogenada (Tabela 2). A parcela experimental foi constituída por cinco linhas de cinco metros de comprimento, espaçadas em 0,45 m entre si. Para a área útil foram consideradas as três linhas centrais, descontando-se 0,5 m em cada extremidade, perfazendo, assim, uma área de 5,40 m² para avaliação.

Tabela 2. Tratamentos utilizados no experimento. Chapadão do Sul, MS.

Tratamentos	Descrição
1. SI + A1	sem inoculação + 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
2. SI + A2	sem inoculação + 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
3. SI+ A3	sem inoculação + 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
4. IS + A0	inoculação de sementes, sem adubação nitrogenada
5. IS+ A1	inoculação de sementes + 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
6. IS + A2	inoculação de sementes + 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
7. IS + A3	inoculação de sementes + 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
8. D1 + A0	100 mL do produto comercial (p.c.) ha ⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada
9. D1 + A1	100 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
10. D1 + A2	100 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
11. D1 + A3	100 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
12. D2 + A0	200 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada
13. D2 + A1	200 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
14. D2 + A2	200 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
15. D2 + A3	200 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
16. D3 + A0	300 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada
17. D3 + A1	300 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
18. D3 + A2	300 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura
19. D3 + A3	300 mL p.c. ha ⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura

SI = sem inoculação, IS = inoculação na semente, A = Doses de N, D = Doses do inoculante, produto comercial, no sulco de cultivo. Fonte: Autores

Na adubação mineral de semeadura da área experimental foram aplicados 412 kg ha⁻¹ do formulado 0-20-20 + 11% Ca + 4% S (Souza & Lobato, 2004). Essa aplicação representa 82,4 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O, respectivamente. A adubação nitrogenada foi feita manualmente de acordo com os respectivos tratamentos.

A semeadura foi realizada manualmente no dia 05 de dezembro de 2012, utilizando o híbrido comercial CD 384 HX. Esse híbrido é de ciclo precoce, atinge a altura média de plantas de 215 a 230 cm com massa de 1000 grãos em média de 352 g (COODETEC, 2012). As sementes foram inoculadas no momento da semeadura, utilizando-se o inoculante Masterfix Gramíneas[®] com as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* (2×10^8 células viáveis mL⁻¹), na dose recomendada pelo fabricante de 100 mL p.c. ha⁻¹. As sementes foram colocadas em saco plástico e após a aplicação do inoculante, foram agitadas por cerca de dois minutos para uniformização do produto sobre a semente.

Para a aplicação do inoculante no sulco de semeadura, foram utilizadas três doses: 100, 200 e 300 mL p.c. ha⁻¹, diluídas em 10 L de água. Após a semeadura manual do milho nos sulcos, foram pulverizadas as doses do inoculante diretamente sobre as sementes, utilizando um pulverizador costal com vazão de 200 L ha⁻¹, e em seguida o sulco foi fechado.

No estádio V5 foi realizada a adubação nitrogenada em cobertura. A aplicação foi realizada manualmente, distribuindo uréia como fonte de N, sobre a superfície do solo, sem incorporação, em uma única vez. Durante a condução do experimento não foi necessário realizar o controle de doenças e pragas. Para plantas daninhas foi feita uma pulverização, 20 dias após a emergência, com 108,8 g ha⁻¹ de Tembotriona + 1000 g ha⁻¹ de Atrazina.

Foram avaliadas (a) o número de espigas por planta, obtidos a partir da contagem de todas as espigas na área útil do experimento; (b) massa de grãos por espiga, obtida a partir da pesagem dos grãos de dez espigas, após sua debulha; (c) massa de cem grãos, obtida a partir da média de contagem e pesagem de oito amostras de cem grãos por parcela; (d) produtividade de grãos, calculado por hectare, a partir da trilha de todas as espigas obtidas na parcela; (e) teor de N nos grãos, foi realizada a partir de uma amostra de grãos retirada de cada parcela. Todas essas avaliações foram realizadas no momento de colheita ou após a colheita do milho e (f) quantificação das bactérias diazotróficas, realizada em amostras de raiz de milho, retirada de três plantas por parcela, coletadas quando a cultura estava em plena floração. Os valores de massa de grãos por espiga, massa de cem grãos e produtividade foram corrigidos para 13% de umidade (b.u.), que constitui a umidade padrão de comercialização de grãos de milho no Brasil.

Para a quantificação de bactéria, aos 55 dias após a emergência das plantas, foi feita a contagem das bactérias diazotróficas, utilizados na quantificação do número mais provável (NMP), obtido por meio da tabela Mc Crady para 3 tubos por diluição (Dobereiner, Baldani & Baldani, 1995).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e foram realizadas correlações de rede e variáveis canônicas para estudar a inter relação entre as variáveis e os tratamentos, utilizando o software Rbio (Bhering, 2017).

3. Resultados e Discussão

Houve efeito dos tratamentos com aplicação de *A. brasilense* associado ao nitrogênio sobre as características massa de grãos por espiga, massa de cem grãos, produtividade de grãos, teor de nitrogênio nos grãos e quantificação das bactérias diazotróficas. Apenas o número de espigas por planta, conhecido como prolificidade, não foi influenciado pelos tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância para número de espigas por planta (NEP), massa de grãos por espiga (MGE), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PG), teor de N nos grãos (TNG) e número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz. Chapadão do Sul, MS.

FV	Quadrados Médios						
	GL	NEP	MGE	M100G	PG	TNG	NMP
Blocos	3	0,039	368,7	3,550	29582	0,00085	1,533e+09
Tratamentos	18	0,007	364,3*	8,779**	1328851**	0,02105**	4,964e+12**
Resíduo	54	0,006	187,7	0,475	40707	0,00146	7,892e+08

Teste F: ** – significativo a 1% de probabilidade; * significativo ao nível de 5% de probabilidade.
Fonte: Autores.

Todos os tratamentos, excetuando-se IS + A0, IS + A1 e D1 + A0 foram favoráveis ao acúmulo de massa nos grãos por espiga (Tabela 4). Os tratamentos favoráveis resultaram num ganho médio em massa de grãos por espiga 15% superior aos tratamentos desfavoráveis. Isso indicou que a inoculação da bactéria em semente, sem a aplicação de nitrogênio ou com a menor dose de nitrogênio testada e a aplicação do inoculante no sulco, na menor dose, sem o uso de nitrogênio, foram desfavoráveis ao acúmulo de massa de grãos por planta.

Tabela 4. Massa de grãos por espiga (MGE), massa de 100 grãos (M100G), produtividade de grãos (PG), teor de N nos grãos (TNG) e número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz. Chapadão do Sul- MS.

Tratamentos	Características avaliadas			
	MGE (g)	M100G (g)	PG (kg ha ⁻¹)	TNG (%)
SI + A1	160,65 a	30,80 c	9403c	1,06b
SI + A2	159,22 a	29,56 d	9483c	0,91d
SI+ A3	165,72 a	30,72 c	8358e	1,09b
IS + A0	140,19 b	27,64 f	8793d	0,98c
IS+ A1	144,74b	30,16 c	9097d	1,16a
IS + A2	164,55 a	32,17 b	8952d	1,07b
IS + A3	160,66 a	33,20 a	7963f	1,05b
D1 + A0	144,37 b	29,93 d	8907d	1,02c
D1 + A1	159,31 a	29,90 d	8598e	1,10b
D1 + A2	174,00 a	32,89 a	9528c	1,13a
D1 + A3	156,36 a	32,53 a	8388e	1,15a
D2 + A0	165,82 a	29,18 d	9194c	0,98c
D2 + A1	159,68 a	31,54 b	9422c	1,19a
D2 + A2	164,01 a	30, 40 c	8992d	1,11a
D2 + A3	164,13 a	31,50 b	8563e	1,15a
D3 + A0	161,35 a	29,64 d	9852b	1,06b
D3 + A1	171,64 a	29,54 d	9489c	1,13a
D3 + A2	174,85 a	28,65 e	10370a	1,13a
D3 + A3	170,20 a	29,60 d	8799d	1,10b
CV (%)	8,50	2,26	2,23	3,53

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

A massa de 100 grãos (Tabela 4), importante componente da produtividade do milho, obteve os maiores valores nos tratamentos que tiveram inoculação de sementes associado a 30 kg ha⁻¹ em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura e nos tratamentos com aplicação das bactérias no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 e 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente. A menor massa de cem grãos foi obtida nos tratamentos com inoculação de semente na ausência de nitrogênio. Este componente da produção, geralmente é o menos afetado por variações nas práticas de manejo e adubação (Borras & Otegui, 2001). A massa de 100 grãos é uma característica influenciada pelo genótipo da planta, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante os estádios de enchimento dos grãos (Cruz et al., 2008). De toda forma, verificou-se que a inoculação da semente com a bactéria ou a aplicação do inoculado no sulco, em sua menor dose, mas ambos na presença de altas doses de nitrogênio, propiciaram maior enchimento dos grãos de milho.

A máxima produtividade de grãos (10370 kg ha⁻¹) foi atingida com a aplicação de *A. brasilense* no sulco de plantio na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ em cobertura (Tabela 4). Este rendimento foi superior em 9,35 % (887 kg ha⁻¹) em relação a maior produtividade de grãos de milho obtida em relação ao tratamento sem inoculação. Quando se procedeu a aplicação das bactérias na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ sem adubação nitrogenada, esse incremento foi de 4,77% (449 kg ha⁻¹) comparado ao tratamento sem inoculação associado a menor dose de N mineral. Esse tratamento superou em 15,4% a média obtida por todos os demais.

De acordo com Dobbelaere, Vanderleyden & Okon (2003) a contribuição das bactérias diazotróficas torna-se maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizantes nitrogenados. Cavallet et al. (2000) constataram que a aplicação de nitrogênio em cobertura proporcionou aumento de 856 kg ha⁻¹ na produtividade do milho quando as sementes foram inoculadas com *Azospirillum* sp. Resultados semelhantes também foram constatados por Hungria et al. (2010), que avaliaram estirpes de *A. brasilense* (Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7) com adubação nitrogenada de semeadura de 24 kg ha⁻¹ e observaram aumento no rendimento de grãos de milho de 662-823 kg ha⁻¹ (24-30%) em relação ao tratamento controle (não inoculado). Por outro lado, Oliveira et al. (2018), avaliaram as duas formas de aplicação de *A. brasilense* (sulco e semente) e presença e ausência de adubação nitrogenada na cultura de milho, e verificaram resultado inferior na produtividade do milho com aplicação do inoculante no sulco na presença de nitrogênio.

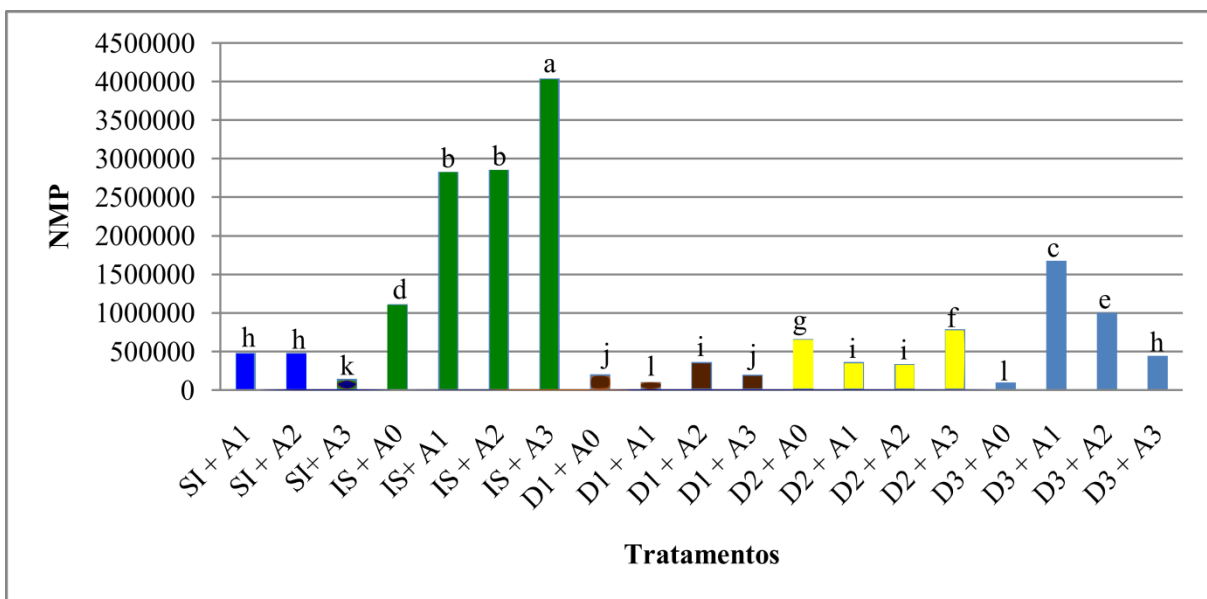
Nos tratamentos onde foram aplicadas as maiores doses de N (30 kg ha⁻¹ em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura) tiveram em média as menores produtividades. Isto pode ser explicado devido a volatilização da amônia, resultante da aplicação da uréia no solo. Provavelmente neste experimento a aplicação de 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, pode ter influenciado nas menores médias de produtividade, embora para as outras características avaliadas, não foi verificado o mesmo comportamento.

Em relação ao teor de nitrogênio nos grãos (Tabela 4), foi possível observar que os maiores teores de nitrogênio foram obtidos nos tratamentos com inoculação de semente associado a 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; aplicação da bactéria no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 20 e 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 120 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente; na dose de 200 mL p.c. ha⁻¹ para todas as doses de N, exceto na sua ausência e na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 e 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente. A menor média foi obtida no tratamento sem inoculação associado a 20 kg ha⁻¹ em semeadura e 120 kg ha⁻¹ em cobertura.

Para o NMP de bactérias presentes nas raízes frescas das plantas (Figura 1), observou-se que o tratamento com inoculação de sementes associado a 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura, foi o que obteve maior quantidade de bactéria por grama de massa fresca de raiz de milho. Já os tratamentos com aplicação das bactérias no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 kg ha⁻¹ em semeadura com 60 kg ha⁻¹ em cobertura e a dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ sem adubação nitrogenada tiveram as menores quantificações. Todos os tratamentos com inoculação de sementes na presença de adubação nitrogenada apresentaram maiores quantidade de bactérias.

As respostas quanto a inoculação com bactérias diazotróficas podem variar devido as condições de condução dos ensaios, à técnica de inoculação, características físicas e químicas do solo e competição com microrganismos nativos do solo (Chotte, Schawartzmann & Monrozier, 2002). Existe uma forte relação entre genótipo e bactéria, onde dependendo do híbrido utilizado, o efeito da inoculação pode ser positivo, nulo ou até mesmo negativo. Braccini et al. (2012) notaram que a inoculação das sementes com estirpes Abv5 e Abv6 de *A. brasilense* proporcionou incremento de produtividade do milho quando comparado aos tratamentos sem inoculação. Reis Junior et al. (2008) já relataram efeito negativo de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados sobre a população de bactérias diazotróficas associadas à cultura do milho. Neste experimento não foi verificado que a adubação nitrogenada influenciou negativamente a população de bactérias.

Figura 1. Número mais provável de bactérias do gênero *Azospirillum* sp. por grama de massa fresca de raiz de milho.



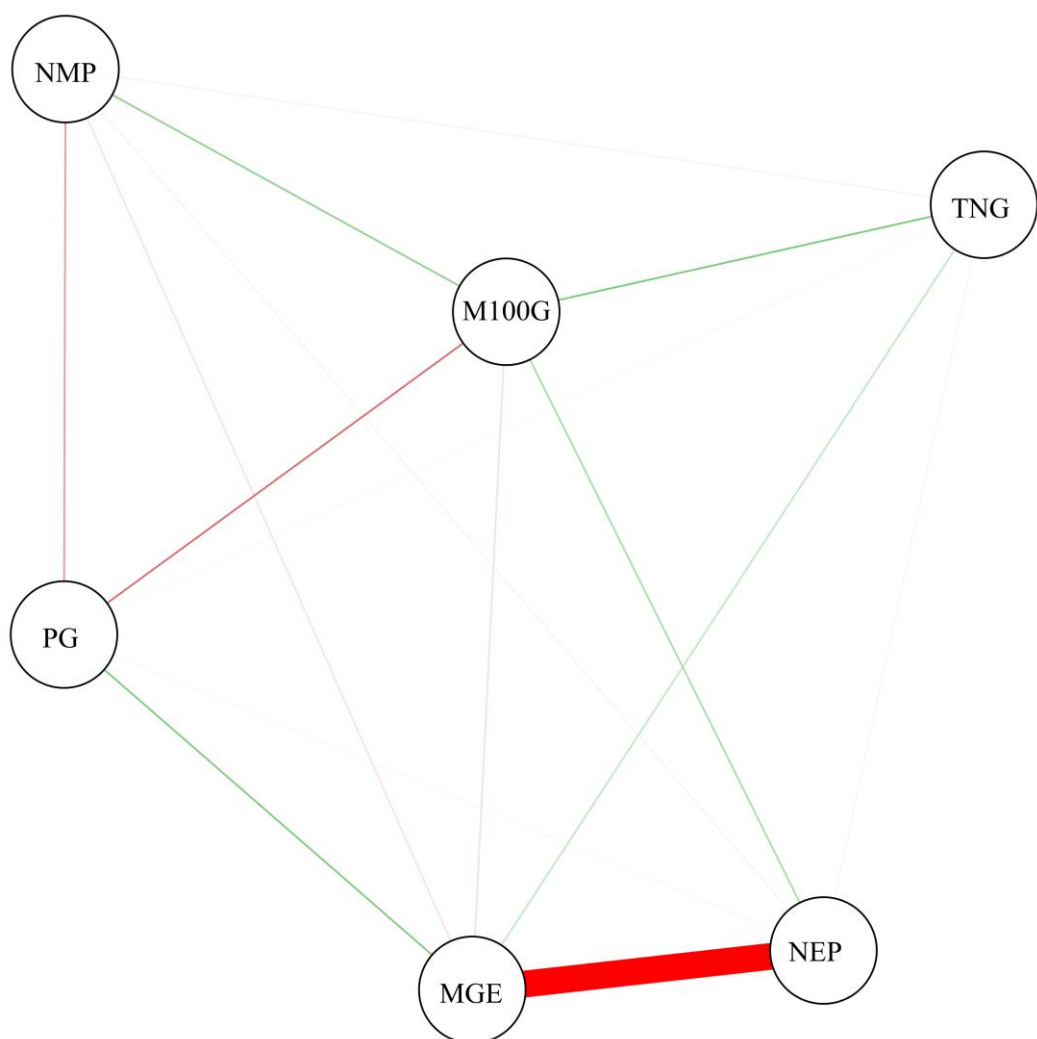
Fonte: Autores.

Na rede de correlação, gerada a partir da matriz de Pearson, a magnitude da correlação é proporcional a espessura das linhas. As correlações negativas ficaram em linhas vermelhas e as correlações positivas expressas em linhas verdes (Figura 2). Observa-se que M100G correlaciona positivamente, em baixa magnitude com TNG, NMP, MGE e NEP e tem correlação negativa fraca com PG, esse resultado indica que plantas com maior massa de cem grãos, geralmente tem maiores teores de nitrogênio nos grãos, maior quantidade de *Azospirillum* sp. nas raízes, aumento na massa de grãos por espigas e maior quantidade de espigas por planta, mas a produtividade de grãos tende a cair quando a massa de cem grãos aumenta.

A PG, teve correlação positiva com massa de grãos por espiga e negativa com M100G e NMP, indicando que conforme há aumento na produtividade dos grãos, o número de bactérias por grama de raiz reduz. A MGE, teve correlação altamente negativa com NEP, e correlação positiva em baixa magnitude com PG, indicando que conforme aumenta o número de espigas por plantas, há uma diminuição na massa de grãos por espigas, já quando há aumento na massa de grãos por espiga, a produtividade tende a aumentar. O acréscimo em espigas por planta não resulta diretamente em aumento de produtividade de milho, pois quando a prolificidade é alta, o tamanho da espiga, principalmente o da segunda espiga,

muitas vezes torna-se muito pequeno, além de poder ficar desgranada e deformada (Veloso et al., 2006).

Figura 2. Rede de correlação entre as variáveis: número mais provável (NMP), teor de nitrogênio nos grãos (TNG), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PG), massa de grãos por espigas (MGE) e número de espigas por planta (NEP). Correlações positivas foram destacadas em verde e correlações negativas destacadas em vermelho. A espessura dos traços são proporcionais a magnitude da correlação.

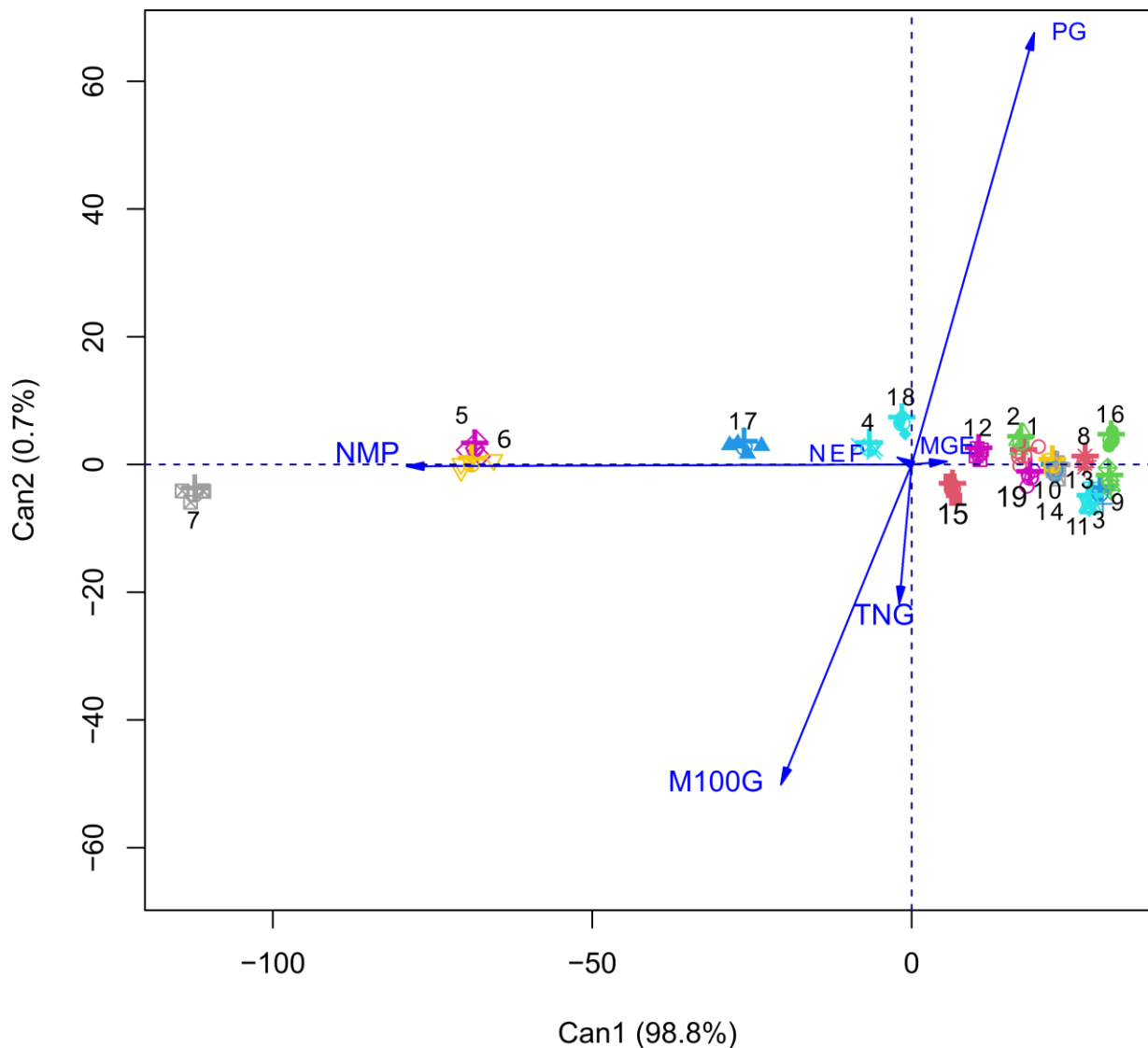


Fonte: Autores.

A análise das variáveis canônicas foi utilizada para verificar a contribuição de cada variável na diferença entre os tratamentos e as variáveis analisadas (Figura 3), pois a

estatística multivariada permite a exploração da correlação entre as variáveis, diferente da análise de variância, que é uma técnica univariada. Neste trabalho, a variância acumulada nas duas primeiras variáveis canônicas foi de 99,4%, conferindo credibilidade para representação em um gráfico bidimensional, visto que as porcentagens de variância acumulada nas duas primeiras variáveis canônicas devem ser superiores a 80% (Mingoti, 2005). Os vetores PG, M100G e NMP foram as variáveis de maior influência nos componentes canônicos. As variáveis PG e M100G têm grande influência no componente 2 e a variável NMP forte influência no componente 1. Nota-se que as variáveis PG e M100G possuem vetores opostos nos quadrantes, demonstrando sua correlação negativa, como observado na Figura 2. Os vetores PG, M100G e NMP são os principais e os maiores causadores da diferenciação entre os tratamentos, porém a influência sobre os tratamentos foi relativamente pequena. Pode-se dizer que apesar dos vetores “puxarem” cada uma para um quadrante, os tratamentos foram influenciados de forma equilibrada por eles, causando pequenas divergências entres si, com exceção dos tratamentos 5, 6 e 7 (inoculação de sementes + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação de sementes + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; inoculação de sementes + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente) que se comportaram de forma semelhante para a vetor NMP, como também pode ser observado na figura 1, onde as maiores quantificações de bactérias foram nos tratamentos que tiveram inoculação de *A. brasilense* nas sementes na presença de adubação nitrogenada. Esses resultados indicam que a inoculação na semente na presença de adubação nitrogenada contribuiu para maior quantificação de bactérias, mas não foi suficiente para influenciar na produtividade de grãos de milho.

Figura 3. Análise de variáveis canônicas entre os tratamentos e as variáveis número mais provável (NMP), teor de nitrogênio nos grãos (TNG), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PG), massa de grãos por espigas (MGE) e número de espigas por planta (NEP).



Fonte: Autores.

4. Considerações Finais

A produtividade de grãos de milho, a massa de cem grãos e o teor de N nos grãos são beneficiados pelo uso da bactéria, aplicada nas sementes ou no sulco de cultivo, no entanto, não substitui a aplicação de nitrogênio, para se atingir altas produtividades.

As doses mais altas de nitrogênio, quando associada a aplicação da bactéria, não são benéficos para as maiores produtividades de grãos de milho.

A produtividade tem correlação positiva com massa de grãos por espiga, que apresenta forte correlação negativa com o número de espigas por planta.

A inoculação de sementes resultou em maiores quantidades de bactérias por grama de raiz. A quantidade de *Azospirillum* sp. por grama de massa fresca de raiz de milho não está correlacionada a produtividade de grãos.

Outros trabalhos, com diferentes doses de *Azospirillum*, outros momentos de aplicação, outras interações com adubação nitrogenada e outras bactérias diazotróficas são indicadas para futuros trabalhos buscando melhorar a performance da cultura do milho.

Referências

- Alvarez, R. D. F., Benetao, J., Barzotto, G. R., Andrade, M. G. D., & Lima, S. F. (2019). Application methods of *Azospirillum brasilense* in first-and second-crop corn. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, 23(11), 840–846.
- Baldani, J. I., & Baldani, V. L. D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), 549-579.
- Bhering, L. L. (2017). Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. *Crop Breeding and applied biotechnology*, 17, 187-190.
- Braccini, L. A., Dan, L. G. M., Piccinin, G. G., Albrecht, L. P., Barbosa, M. C., & Ortiz, A. H. T. (2012). Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associate with the use of bioregulators in maize. *Revista Caatinga*, 25(2), 58-64.
- Borrás, L., & Otegui, M. E (2001). Maize kernel weight response to post-flowering source-sink ratio. *Crop Science*, 41(6), 1816-1822.
- Cavallet, L. E., Pessoa, A. C. S., Helmich, J. J., Helmich, P. R., & Ost, C. F. (2000). Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4(1), 129-132.

Chotte, J., Schwartzmann, A., & Bally, R., Monrozier, L. J (2002). Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1083-1092.

COODETEC. (2012). *Guia de produtos soja e milho Brasil Centro*. Disponível em: http://www.coodetec.com.br/downloads/Guia_de_produtos_Soja_e_Milho_-_Centro.pdf. Acesso em: 3 junho 2020.

Croes, C. L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., & Michiels, K. W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 139(9), 2261-2269.

Cruz, C. S. S., Pereira, F. R. S., Santos, J. R., Albuquerque, A. W., & Pereira, R. G. (2008). Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio direto, no Estado de Alagoas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12(1), 62-68.

Cunha, F. F., Magalhães, F. F., & Castro, M. A (2013). Métodos para estimativa da evapotranspiração de referência para Chapadão do Sul – MS. *Engenharia na agricultura*, 21(2), 159-172.

Dartora, J., Guimarães, V. F., Marini, D., & Sander, G. (2013). Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17(10), 1023–1029.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22(2), 107-149.

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: Embrapa cerrado.

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

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M. S., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil*, 331, 413–425.

Kappes, C., Arf, O., Valentini, M. A., Ferreira, J. P., Dal Bem, E. A., Portugal, J. R., & Vilela, R. G. (2013). Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(2), 527-538.

Mingoti, S. A. 2005. *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada*. Belo Horizonte, MG: UFNG.

Morais, T. P. (2012). *Adubação nitrogenada e inoculação com Azospirillum brasilense em híbridos de milho*. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. (Mestrado em Agronomia).

Moreira, R. C., Valadão, F. C. A., & Valadão Junior, D. D. (2019). Desempenho agrônômico do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. *Revista de Ciências Agrárias*, 62, 1-10.

Müller, T. M., Sandini, I. E., Rodrigues, J. D., Novakowski, J. H., Basi, S., & Kaminski, T. H. (2016). Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases maize yield. *Ciência Rural*, 46(2), 210–215.

Oliveira, R. P. Lima, S. F., Alvarez, R. C. F., Baldani, V. L. D., Oliveira, M. P., & Brasil, M. S. (2018). *Azospirillum brasilense* inoculation and management of fertilizer nitrogen in maize. *Brazilian Journal of Agriculture*, 93(3), 347 – 361.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parrira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1. Acesso em: 10 junho 2020.

Portugal, J. R., Arf, O., Peres, A. R., Gitti, D. C., & Garcia, N. F. S. (2017). Coberturas vegetais, doses de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho no Cerrado. *Revista Ciência Agronômica*, 48(4), 639-649.

Santos, H. G., Jacomine, P. K. T., Dos Anjos, L. H. C., Oliveira, V. A., Lumberras, J. F., Coelho, M. R., Almeida, J. A., Araújo Filho, J. C., Oliveira, J. B., & Cunha, T. J. F. (2018). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 5. ed. Brasília: Embrapa cerrado.

Silva, F. C., Silva, M. M., & Libadi, P. L. (2013). Aplicação de nitrogênio no cultivo de milho, sob sistema plantio direto: efeitos na qualidade física do solo e características agronômicas. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 3513-3528.

Raij, B. van, Andrade, J. C., Cantarella, H., & Quaggio, J. A. (2001). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agronômico.

Reis, V. M. (2007). *Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.

Reis Júnior, F. B., Machado, C. T. T., Machado, A. T., Mendes, C. I., & Mehta, A. (2008) *Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de Azospirillum amazonense e Herbaspirillum seropedicae associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado*. Planaltina: Embrapa Cerrados.

Sousa, D. M. G., & Lobato, E. (eds). 2004. *Cerrado correção do solo e adubação*. 2 ed. Planaltina: Embrapa Cerrados.

Veloso, M. E. C., Duarte, S. N., Dourado Neto, D., Miranda, J. H., Silva, E. C., & Sousa, V. F. (2006). Doses de nitrogênio na cultura do milho, em solos de várzea, sob sistema de drenagem subterrânea. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 5(3), 382-394.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Lucynara Merquides Contardi – 20%

Rita de Cássia Félix Alvarex – 20%

Sebastião Ferreira de Lima – 20%

Vespasiano Borges de Paiva Neto – 20%

Marivaine da Silva Brasil – 10%

Roberta de Vasconcelos Ramires – 10%