

# Métodos de inoculação de *Azospirillum brasilense* (Rhodospirillaceae) associado à adubação nitrogenada na cultura do milho

*Inoculation methods of Azospirillum brasilense (Rhodospirillaceae) associated with nitrogen fertilization in maize crop*

DOUGLAS RODRIGUES OLIVEIRA  
Discente do curso de Agronomia (UNIPAM)  
E-mail: douglasrodrigues95@hotmail.com

LUÍS HENRIQUE SOARES  
Professor orientador (UNIPAM)  
E-mail: luishs@unipam.edu.br

---

**Resumo:** O milho é considerado um dos principais cereais cultivados no mundo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasiliense* associado à adubação nitrogenada na cultura do milho. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, cultivado em vasos. Os tratamentos foram postos em delineamento de blocos casualizados sendo 6 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos foram compostos da seguinte maneira: Tratamento 1 - Controle (sem inoculação e adubação nitrogenada); tratamento 2 - Somente nitrogênio; tratamento 3 - *Azospirillum brasiliense* via semente; tratamento 4 - *Azospirillum brasiliense* via foliar; tratamento 5 - Nitrogênio + *Azospirillum brasiliense* via semente e tratamento 6- Nitrogênio + *Azospirillum brasiliense* via foliar. Houve resultados significativos para altura de plantas, diâmetro de colmo, teor de clorofila, número de folhas e massa seca de folhas. A inoculação via foliar e via sementes, associada ao adubo nitrogenado, apresentou maiores resultados, quando comparados aos tratamentos sem adubo nitrogenado.

**Palavras-chave:** Milho. Inoculação. Nitrogênio.

**Abstract:** Corn is considered one of the main cereals grown in the world. The objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* associated with nitrogen fertilization in corn. The study was conducted in a greenhouse, grown in pots. The treatments were placed in a randomized block design with 6 treatments and 5 repetitions. The treatments were composed as follows: Treatment 1 - Control (without inoculation and nitrogen fertilization); treatment 2 - Nitrogen only; treatment 3 - *Azospirillum brasiliense* via seed; treatment 4 - *Azospirillum brasiliense* via leaf; treatment 5 - Nitrogen + *Azospirillum brasiliense* via seed and treatment 6- Nitrogen + *Azospirillum brasiliense* via leaf. There were significant results for plant height, stem diameter, chlorophyll content, number of leaves and dry leaf mass. The inoculation via leaf and via seeds, associated with nitrogen fertilizer, showed better results when compared to treatments without nitrogen fertilizer.

**Keywords:** Corn. Inoculation. Nitrogen.

---

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no Brasil e no mundo. É a base de inúmeros produtos utilizados para alimentação humana, além de ser o principal componente de energia para nutrição animal. Serve para alimentação animal tanto em forma de grão quanto em forma processada, dando origem a rações e a matéria-prima para a indústria, em função da quantidade ou da qualidade das reservas acumuladas nos grãos (ALVES *et al.*, 2015).

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura e é o que mais limita a produção. Ele exerce função importante nos processos da planta como constituinte de enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e clorofila (FARINELLI; LEMOS, 2012).

Segundo Mortate *et al.* (2018), o aumento da produtividade de grãos depende de vários fatores. Um deles é a eficiência da absorção de nitrogênio (N) pela planta e sua translocação para os grãos. Além de ser indispensável para a cultura do milho, o nitrogênio (N) também é o elemento que mais ajuda para o incremento dos custos na cultura (MORTATE *et al.*, 2018).

Por causa da alta demanda energética do processo de fabricação de fertilizantes nitrogenados, há alguns impactos provocados ao meio ambiente (ROCHA *et al.*, 2013). Brum *et al.* (2016) registram o excesso de nitrato nos mananciais como um dos efeitos negativos causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados.

Uma das formas para se conseguir manter o rendimento da cultura do milho e a diminuição do uso dos fertilizantes nitrogenados é a inoculação de sementes com o uso de bactérias diazotróficas, que tem a capacidade de fixar o nitrogênio (N) atmosférico, deixando-o disponível para a planta. O nitrogênio (N) que é fixado pela bactéria torna-se disponível para a planta pela excreção direta da bactéria ou pela mineralização de bactérias mortas (PANDOLFO *et al.*, 2015). Uma das bactérias que faz esse papel é a do gênero *Azospirillum*.

Além do benefício da fixação biológica de nitrogênio, a inoculação com *Azospirillum brasilense* impulsiona um crescimento melhor da parte aérea e do sistema radicular da planta, por meio da produção de hormônios promotores de crescimento, como as giberelinas, as auxinas e as citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2013). As bactérias promotoras de crescimento de plantas impulsionam o desenvolvimento das plantas por alguns mecanismos, estando incluída a síntese de fitormônios; além disso, promove melhoria da nutrição nitrogenada e de outros nutrientes, minimização de estresse e controle biológico da microbiota patogênica. Destaca-se que essas bactérias auxiliam no incremento da superfície de absorção das raízes da planta e, com isso, ocorre aumento considerável do volume de solo explorado (HUNGRIA *et al.*, 2010).

Uma das alternativas de se reduzir a utilização de adubos nitrogenados é a aplicação da bactéria *Azospirillum brasiliense* associada ao nitrogênio. Alguns trabalhos relatam os benefícios dessa bactéria no crescimento de raízes, parte aérea e na fixação biológica de nitrogênio.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasiliense* associado à adubação nitrogenada na cultura do milho.

## 2 METODOLOGIA

Este estudo foi realizado em casa de vegetação, localizada no Centro Universitário Patos de Minas - UNIPAM, em Patos de Minas, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi o delineamento em blocos casualizados (DBC), com seis tratamentos e cinco repetições (Tabela 1).

**Tabela 1:** Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio

Tratamentos	Descrição	Dose	Época de aplicação do <i>Azospirillum</i>
T1	Controle	0 Kg/ ha <sup>-1</sup> de N	-
T2	Nitrogênio	20 Kg/há ha <sup>-1</sup> e 140 kg/ha <sup>-1</sup>	-
T3	<i>Azospirillum brasiliense</i> * via semente	100mL para 25 kg de semente	TS
T4	<i>Azospirillum brasiliense</i> via foliar	500 mL.ha <sup>-1</sup>	V <sub>4</sub>
T5	Nitrogênio + <i>Azospirillum brasiliense</i> via semente	20 Kg/ ha <sup>-1</sup> (plantio)140 kg/ ha <sup>-1</sup> (cobertura) e 100mL para 25 kg de semente	TS
T6	Nitrogênio + <i>Azospirillum brasiliense</i> via foliar	20 Kg/ ha <sup>-1</sup> (plantio)140 kg/ ha <sup>-1</sup> (cobertura) e 500 mL.ha <sup>-1</sup>	V <sub>4</sub>

\* Produto comercial denominado de Azos.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

**Tabela 2:** Análise de solo do estudo na camada de 0 a 20 centímetros

pH	P-rem	g	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC <sub>t</sub>	CTC <sub>r</sub>
Água	mg/dm <sup>3</sup>	dag/kg	mg/dm <sup>3</sup>		cmolc/dm <sup>3</sup>						
m	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S	Argila	Silte	Areia	COT
%		mg/dm <sup>3</sup>									dag/kg
5,25	2,81	1,64	2,53	17,00	0,92	0,18	0,07	4,42	1,14	1,21	5,56
5,8	20,6	0,06	1,8	40,4	2,5	0,5	2,4	790	106	104	0,95

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Para a realização do estudo, coletou-se o solo para profundidade de 0 a 20 cm. As amostras foram enviadas para o laboratório de análises de solo da Terrena em Patos de Minas.

O solo foi peneirado. Utilizou-se a proporção de 2:1, sendo essa proporção dois litros de terra para um de areia. Em seguida, o solo peneirado e homogêneo foi autoclavado a fim de se eliminarem os microrganismos presentes.

A semeadura foi realizada no dia, que foi o dia 19 de dezembro de 2019. Fez-se a inoculação do produto Azos® nas sementes de milho. Estas foram colocadas na sombra e deixadas por um período de 60 minutos. Após esse período, foram semeadas. Para fazer essa inoculação, as sementes foram pesadas numa balança de precisão modelo G Cehara, com precisão de 0,01 g. Em seguida, utilizou-se um béquer de um litro a fim de que se colocasse a dosagem recomendada do produto e da água, ambos misturados com um bastão de vidro e colocados em um saco plástico e deixados à sombra.

Os adubos que foram utilizados no estudo tiveram como base cálculos seguindo o livro 5ª aproximação, o qual ajudou na interpretação da análise de solo. Utilizaram-se

os adubos ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio, os quais tiveram as seguintes dosagens: 0,250 gramas no dia da semeadura de ureia por vaso, o equivalente a 20 Kg/ha<sup>-1</sup>; 1,800 gramas aos 20 após a semeadura em cada vaso, o equivalente a 140 Kg/ha<sup>-1</sup>; 3,700 gramas de superfosfato simples por vaso, o equivalente a 120 Kg/ha<sup>-1</sup>, o qual foi aplicado totalmente no dia da semeadura; 0,850 gramas de cloreto de potássio, o equivalente a 90 Kg/ha<sup>-1</sup>, utilizado totalmente durante a semeadura.

Para alcançar esses valores, foi utilizada a balança de precisão 0,0001 g de modelo AY220, para pesá-los, colocando-os em copos pequenos de plástico, os quais foram identificados. Para o plantio, foram utilizadas sementes do híbrido P3340VYHR. Semearam-se seis sementes por vaso, de forma manual. O desbaste ocorreu aos 15 dias após a semeadura, deixando duas plantas por vaso. Nesse procedimento, deixaram-se as plantas que apresentaram melhor vigor visualmente.

Para aplicação do nitrogênio na cobertura, o adubo ureia foi pesado em balança de precisão 0,001 g, do modelo Marte, colocado em copos pequenos de plásticos devidamente identificados e levados para o local da aplicação. Foi feito um risco no solo, no formato de um círculo. Após isso, colocou-se o adubo. Depois de feita a aplicação, os vasos foram irrigados, diariamente, com o mesmo volume de água.

A inoculação via foliar ocorreu no momento em que o milho estava no estágio V4 (quatro folhas expandidas), aos 23 dias após a semeadura. Para se utilizar a dosagem recomendada, usou-se uma pipeta para coletar o produto e passar para o béquero. Em seguida, fez-se a mistura com água, aplicou-se em dois tratamentos do estudo, em um total de 20 plantas aplicadas. Utilizaram-se 80 mL de água para aplicação e 0,18 mL do produto Azos® para aplicação total, a qual foi realizada através de borrifador.

No decorrer do estudo, necessitou-se de irrigação com uma solução de Johnson para as plantas, devido a sintomas de deficiência do nutriente fósforo. Ao invés de se molhar com a água normalmente, a solução foi preparada e aplicada durante 2 dias, aos 28 dias após a semeadura; aos 42 dias à semeadura, foi aplicada em todos os vasos do estudo.

Os nutrientes que compõem a solução de Johnson (1957) e sua dosagem utilizada quando foi usada no estudo serão apresentados a seguir na Tabela 3.

**Tabela 3:** Solução de Johnson (1957) aplicada no ensaio

Sais	g/1000 L
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O - Nitrato de cálcio	457,7
KNO <sub>3</sub> - Nitrato de potássio	251,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Fosfato de potássio	142,9
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O - Sulfato de magnésio	251,3
FeETDA - Ferro quelatizado	23,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> - Ácido bórico	1,3
MnSO <sub>4</sub> - Sulfato de manganês	0,794
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O - Sulfato de zinco	0,106
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O - Sulfato de cobre	0,026
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O-(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo 7O <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O - Ácido molibídico	0,013

Observação: A solução nutritiva passou por adaptações, portanto os sais em destaque são os utilizados pelo laboratório Nufep.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

No dia 31 de janeiro, fez-se o uso de um fungicida para controle de surgimento de uma doença conhecida como helmintosporiose. Utilizou-se o produto opera. Fez-se a aplicação em todos os tratamentos, mesmo sem haver a doença neles, para melhor prevenção. Utilizou-se, para essa aplicação, 330 mL de água e 818 microlitros de produto. A aplicação aconteceu com um borrifador.

A primeira avaliação do estudo foi realizada aos 10 dias depois de feita a inoculação via foliar. Essa primeira avaliação ocorreu com as seguintes avaliações: altura de plantas, diâmetro de colmo, teor de clorofila, número de folhas. A segunda avaliação ocorreu 20 dias depois de feita a inoculação via foliar, com os mesmos parâmetros para avaliação.

## 2.1 AVALIAÇÕES

### 2.1.1 Altura de plantas

Para realizar a avaliação de altura de plantas, a planta foi medida com o auxílio de uma trena de cinco metros, medindo-se da superfície do solo junto à planta até a última folha expandida. Mediram-se as duas plantas do vaso e utilizou-se sua média para os testes estatísticos. Foi feito assim para todo os vasos do estudo e para as avaliações de diâmetro de colmo, número de folhas, massa seca de raiz e parte área e volume de raiz.

### 2.1.2 Diâmetro de colmo

Para o diâmetro de colmo, a planta foi medida com um paquímetro digital, medindo-se cinco centímetros acima do solo.

### 2.1.3 Teor de clorofila

O teor de clorofila das plantas foi medido com a ajuda do clorofilômetro, chamado SPAD. Usou-se o modelo Konica Minolta. Mediram-se quatro folhas por planta, sendo as que se situavam no terço médio.

Para a segunda avaliação, foram medidas quatro folhas por planta do vaso, sendo folhas do terço médio e do terço superior.

### 2.1.4 Número de folhas

A avaliação do número de folhas foi feita manualmente, considerando-se somente folhas expandidas.

### 2.1.5 Volume de raiz

Para a determinação do volume de raiz, retiraram-se as plantas do vaso, peneirando toda a terra do vaso; lavaram-se as raízes em água corrente. Então, separou-

se a planta com o auxílio de uma faca, cortando-a em folha, colmo e raízes, colocados em papel Kraft e identificados.

No laboratório, identificou-se o volume de raiz, o qual ocorreu utilizando-se duas provetas de 500 mL, estando uma proveta com água até os 500mL e a outra vazia. Então, colocaram-se as raízes da amostra na proveta que ficou vazia; pegou-se a água da proveta que estava com água e colocou-a na proveta em que havia as raízes. O que sobrou de água na proveta que tinha somente água foi considerado o volume de raiz.

### 2.1.6 Massa seca de raiz e parte aérea

Após a identificação do volume de raiz, colocaram-se as raízes, em papel Kraft, identificadas, que foram levadas para a estufa de ar com circulação forçada e deixadas para secagem durante 72 horas, em uma temperatura de 65° C. Posteriormente à secagem, as amostras foram pesadas em balança de precisão do modelo Marte, que é uma balança de precisão de 0,01g. O colmo e as folhas que foram separados e colocados em papel Kraft, também foram colocados na estufa à mesma temperatura, quantidade de horas; após isso, pesados na mesma balança que as raízes.

O experimento na casa de vegetação teve duração de 50 dias e, após isso, foi levado para o laboratório para serem feitas as avaliações de volume de raiz e massa seca de raízes e parte aérea, as quais foram descritas acima.

### 2.1.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2000).

## 3 RESULTADOS

**Tabela 4:** Valores obtidos de altura de plantas de duas avaliações em centímetros (cm), aos 36 dias pós semeadura e aos 46 dias pós semeadura

Tratamentos	Altura (cm)	
	36 dias	46 dias
Controle	71,400b	83,80c
Somente Nitrogênio	87,100a	97,60ab
Azos via semente	78,600b	90,40bc
Azos via foliar	77,500b	90,80bc
Nitrogênio + Azos via semente	89,800a	103,90a
Nitrogênio + Azos via foliar	91,625a	105,00a
CV(%)=	5,02	5,69
DMS=	8,44	11,011

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Os resultados obtidos tanto na primeira como na segunda avaliação foram significativos pelo Teste Tukey a 5%. Tiveram seus melhores resultados os tratamentos contendo o produto Azos® via semente associado ao adubo nitrogenado ureia e o outro tratamento contendo o produto Azos® via foliar associado ao adubo nitrogenado. O tratamento que apresentou somente a utilização de adubo nitrogênio teve resultados tão consideráveis como os outros dois citados anteriormente. Para a segunda avaliação, os melhores resultados foram os tratamentos contendo nitrogênio + Azos® via semente e o tratamento contendo nitrogênio + Azos® via foliar.

Os resultados são justificados por alguns autores. Segundo Coelho *et al.* (2017), a interação entre a bactéria e a planta pode ocorrer de forma direta e indireta. Na forma direta, essa interação entre planta e bactéria pode proporcionar a biossíntese de hormônios promotores do crescimento como citocinina, giberelina que atua no alongamento do caule, auxina e de reguladores de crescimento como óxido nítrico, além da fixação biológica de nitrogênio.

Outro fator que ajudou para que os tratamentos contendo *Azospirillum brasiliense* e adubação nitrogenada possuísem melhores resultados foi o seguinte: a planta de milho, além das características da bactéria, teve também o auxílio do adubo nitrogenado; além de ser um constituinte primário dos nucleotídeos, o nitrogênio faz parte da molécula de clorofila e de diversas enzimas que estão ligadas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas e atua em alguns processos da planta como respiração e fotossíntese (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006).

Resultados similares foram encontrados por Kappes *et al.* (2013), que obtiveram maior altura de plantas com inoculação via sementes de *A. brasiliense*, com aplicação de nitrogênio em cobertura, em trabalho realizado no campo.

Por sua vez, Hungria (2011) relata alguns trabalhos sobre a utilização de *Azospirillum spp.* em inoculação via sementes e, em outros trabalhos, em via foliar que possibilitou as plantas de milho maior altura, maior área foliar, maior teor de nitrogênio nas folhas e aumento do número de espigas, em ensaios realizados em campo.

**Tabela 5:** Valores obtidos para diâmetro do colmo pelo paquímetro digital em milímetros (mm), primeira avaliação (36 dias após semeadura), segunda avaliação (46 dias após a semeadura)

Tratamentos	Diâmetro de colmo (cm)	
	36 dias	46 dias
Controle	11,32b	11,700b
Somente Nitrogênio	14,72a	15,350a
Azos via semente	12,34b	13,340b
Azos via foliar	12,49b	13,220b
Nitrogênio + Azos via semente	15,36a	15,750a
Nitrogênio + Azos via foliar	16,15a	16,325a
CV(%)=	6,00	6,46
DMS=	1,672	1,872

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Os resultados obtidos para o parâmetro de diâmetro do colmo, tanto na primeira avaliação quanto na segunda avaliação, mostraram-se significativos pelo teste Tukey a 5%. Na primeira avaliação, os melhores resultados foram os seguintes tratamentos: somente nitrogênio, adubação nitrogenada associada ao produto Azos® via semente e o tratamento contendo adubação nitrogenada associada ao produto Azos® via foliar. Já na segunda avaliação, os tratamentos que apresentaram melhores resultados foram os mesmos da primeira avaliação, sendo o tratamento contendo somente nitrogênio, o tratamento contendo adubo nitrogenado associado ao produto Azos® via semente e tendo também o tratamento contendo adubação nitrogenada associado com o produto Azos® via foliar. O tratamento que conteve somente adubação nitrogenada, tanto na primeira como na segunda avaliação, teve resultados tão significativos quanto aos descritos anteriormente.

O milho armazena, no colmo, grande parte das reservas de amido, que serão utilizadas depois na produção de grãos. Os tratamentos que tiverem maior diâmetro de colmo terão mais reservas no enchimento de grãos (ROCKENBACH *et al.*, 2017).

O diâmetro do colmo está relacionado ao percentual de acamamento e quebraimento de planta na gramínea conhecida como milho, fato que pode resultar em perdas significativas na produção (KAPPES *et al.*, 2013). Sendo assim, os colmos que apresentaram ser mais grossos têm menores chances de acamamento; os tratamentos que apresentaram adubo nitrogenado no experimento têm essas chances reduzidas.

Resultados similares aparecem em experimento realizado por Guimarães *et al.* (2014), sendo utilizado o *Azospirillum brasiliense* via sementes, no trabalho; houve também inoculação de *Herbaspirillum seropidicae*, em diferentes tipos de solos; as plantas com inoculação apresentaram resultados superiores no parâmetro de diâmetro de colmo, em experimento conduzido em casa de vegetação.

Um fator para que os tratamentos que não possuíssem nitrogênio tivessem resultados menores é o seguinte: a planta de milho tem o nitrogênio como nutriente mais importante; sua deficiência pode gerar colmos mais finos e aumento da taxa de tombamento das plantas (FERREIRA, 2012). Em função disso, os tratamentos que apresentaram a inoculação de produto Azos® tanto via foliar como via semente associada à adubação nitrogenada apresentaram resultados consideráveis; a inoculação com bactérias que são do gênero *Azospirillum* ajudam na absorção de nitrogênio; as bactérias têm a capacidade de sintetizar fitormônios, promovendo o aumento de raízes laterais e pelos radiculares, o que faz com que a planta amplie sua superfície de contato com os nutrientes, fazendo assim com que a planta possa absorver mais água e nutrientes, inclusive o nitrogênio (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

**Tabela 6:** Valores obtidos para teor de clorofila da folha do milho pelo aparelho Spad, primeira avaliação (36 dias após semeadura), segunda avaliação (46 dias após a semeadura)

Tratamentos	Teor de clorofila (Índice Spad)	
	36 dias	46 dias
Controle	28,720c	19,940c
Somente Nitrogênio	33,460bc	25,360bc
Azos via semente	26,440c	20,700bc
Azos via foliar	24,600c	20,560c
Nitrogênio + Azos via semente	34,940a	28,280a
Nitrogênio + Azos via foliar	37,075a	26,475a
CV(%)=	8,53	9,82
DMS=	5,337	4,698

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Para o parâmetro teor de clorofila, o estudo apresentou resultados significativos na primeira e na segunda avaliação pelo teste de Tukey a 5%.

Na primeira avaliação, os melhores resultados foram para os tratamentos que apresentaram associação entre o produto Azos® e a adubação nitrogenada, sendo o tratamento com adubação nitrogenada e Azos® via foliar, seguido do tratamento de adubação nitrogenada junto com Azos® via semente.

Para a segunda avaliação, os tratamentos que apresentaram os melhores resultados também foram os tratamentos em que havia a associação entre nitrogênio e o produto Azos®, via foliar ou via semente, com os seguintes valores: adubação nitrogenada associada ao produto Azos® via semente e tratamento com adubação nitrogenada associada ao produto Azos® via foliar. Os resultados da segunda avaliação diminuíram em relação à primeira avaliação, possivelmente pelo fato de o teor de clorofila na segunda avaliação ter sido medido em duas folhas do terço médio e duas do terço superior que são folhas mais novas. Isso reduziu o teor de clorofila da primeira para segunda avaliação.

Os resultados são justificados devido ao *Azospirillum brasilense* ser uma bactéria capaz de fazer a fixação biológica de nitrogênio, pelo fato de possuir a enzima nitrogenase, sendo assim ela reduz o N<sub>2</sub> atmosférico para N<sub>3</sub>, disponibilizando para a planta uma forma que seja assimilável para ela (FREITAS; RODRIGUES, 2010). O nitrogênio faz parte de mecanismos da fotossíntese, faz parte da molécula de clorofila, enzimas, coenzimas e DNA da planta (GAZOLA *et al.*, 2014). Com isso, os tratamentos que possuem o nitrogênio associado ao *A. brasilense* tiveram maiores teores de clorofila.

Um fator para o tratamento de *A. brasilense* separado do nitrogênio não ter sobressaído sobre os tratamentos em que tiveram associação é que essa bactéria é considerada complementar para os fertilizantes químicos usados para melhorar o rendimento das culturas em que são utilizados (HAYAT *et al.*, 2010).

Alguns autores também relatam em seus trabalhos resultados maiores no parâmetro teor de clorofila. Quadros *et al.* (2014) relatam, em um experimento realizado no campo, maior valor para três tipos de híbridos de milho quando foram inoculados

via semente com uma mistura de três bactérias do gênero *Azospirillum*, entre elas estava *A.brasiliense*.

Costa *et al.* (2015), em um experimento realizado no campo, avaliaram o resultado da eficiência de inoculante com *Azospirillum brasilense* no crescimento e na produtividade de milho de segunda safra. No experimento, foi utilizada inoculação via semente e via foliar associada ao adubo nitrogenado na cobertura. Quando inoculado, houve um aumento de 4% no teor de clorofila, comparado ao tratamento em que não houve inoculação, em experimento realizado no campo.

**Tabela 7:** Avaliação do número de folhas por planta, Patos de Minas, 2020

Tratamentos	Número de folhas
Nitrogênio + Azos via foliar	7,75a
Nitrogênio + Azos via semente	7,50a
Somente Nitrogênio	7,30a
Azos via semente	6,20b
Azos via foliar	6,00b
Controle	5,90b
CV(%)=	5,00
DMS=	0,687

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Para esses resultados, foram levados em conta os resultados referentes à primeira avaliação feita, visto que a segunda avaliação obteve os mesmos resultados da primeira. O tempo de avaliação de uma para outra foi de 10 dias.

Os resultados referentes ao número de folhas por planta apresentaram efeito significativo. Os tratamentos que apresentaram a adubação nitrogenada juntamente com uma forma de inoculação via semente ou foliar obtiveram os melhores resultados. O tratamento que apresentou somente adubação nitrogenada também apresentou um resultado igual estatisticamente comparado aos descritos anteriormente.

Entretanto os tratamentos que apresentaram somente a inoculação seja via semente, seja via foliar e o controle, o qual não houve uso de adubo nitrogenado nem inoculação, obtiveram resultados significativamente abaixo em relação aos outros.

O produto utilizado é o Azos®, o qual é constituído da bactéria *Azospirillum brasilense*, que é uma bactéria promotora de crescimento, a qual corresponde a micro-organismos que são benéficos às plantas e que têm a capacidade de colonizar as raízes e as folhas, a região da filosfera, rizosfera e os tecidos internos da planta (HUNGRIA *et al.*, 2010). Com isso, os tratamentos que utilizaram a bactéria com o nitrogênio apresentaram os melhores resultados, juntamente com o tratamento que utilizou somente nitrogênio.

Outro fator é que a inoculação com *Azospirillum brasilense* impulsiona um crescimento melhor da parte aérea e do sistema radicular da planta através da produção de hormônios promotores de crescimento, como as giberelinas, auxinas e citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Um fator relevante a se considerar é o seguinte: o fato de os tratamentos com somente a inoculação de uma das formas e o controle terem apresentado um menor

número de folhas deve-se à ausência de nitrogênio, visto que este é um dos nutrientes mais importantes na cultura, e sua ausência pode influenciar no desenvolvimento da planta, podendo até causar amarelecimento nas folhas mais velhas e até a queda delas (ROCKENBACH *et al.*, 2017).

**Tabela 8:** Massa seca de raiz (MSR) em gramas e volume de raiz (VR) em mL

Tratamentos	MSR	VR
Controle	14,648ab	7,60a
Somente Nitrogênio	10,838b	10,30a
Azos via semente	16,498ab	12,20a
Azos via foliar	20,542a	12,70a
Nitrogênio + Azos via semente	14,792ab	10,90a
Nitrogênio + Azos via foliar	16,973ab	10,87a
CV(%)=	28,28	24,95
DMS=	9,042	5,475

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Para massa seca de raízes e volume de raiz, os resultados se apresentaram não significativos pelo teste de Tukey a 5%.

Durante a condução do estudo, foi verificada uma deficiência de fósforo em todos os tratamentos, porém os tratamentos que apresentaram somente nitrogênio e os que possuíam a inoculação via semente associada ao adubo nitrogenado como também o tratamento que possuía inoculação via foliar associada ao adubo nitrogenado foram os tratamentos que apresentaram índices mais elevados na deficiência de fósforo.

Sendo o fósforo um nutriente importante para o crescimento radicular, um dos fatores que pode ter ocasionado a deficiência do fósforo é a baixa eficiência de aproveitamento desse nutriente pela cultura, fato que ocorre pela alta capacidade de adsorção do fósforo ao solo, adicionado ao solo, o que reduz sua disponibilidade às plantas. (GAZOLA *et al.*, 2013).

Outro fator possível é que o nutriente fósforo possui lenta taxa de difusão na solução do solo, o que o torna menos disponível na rizosfera (ALMEIDA *et al.*, 2016). Um fator que deve ser levado em conta é a taxa de eficiência do nutriente fósforo, visto que esta leva em consideração a eficiência na absorção, que é obtida pela quantidade do nutriente extraído pela planta e pela quantidade do nutriente extraído no solo, o que, no estudo, foi calculado por outro método (PEREIRA *et al.*, 2013).

Um motivo também é que a eficiência do fósforo está relacionada à própria capacidade de solubilidade das fontes. O fato de os fertilizantes comerciais apresentarem maior solubilidade tem influência na absorção da planta, visto que a liberação rápida do nutriente pode ajudar a favorecer o processo de adsorção deste e a precipitação das formas que são solúveis pelos componentes do solo, tornando o nutriente mais indisponível para a planta. Quando maior é o teor de argila no solo, maior será a expressão desse acontecimento. O estudo possuía um solo de 79% de argila (NOVAIS; SMYTH, 1999). Guimaraes *et al.* (2014) também relatam que o crescimento do sistema radicular do milho é influenciado por fatores químicos, biológicos e físicos do solo.

Outros fatores relacionados podem ser as formas de inoculação, as variações do ambiente e do solo, as características das estripes e as características genéticas das plantas, que podem influenciar na resposta da bactéria a gramínea (HUNGRIA, 2011; MORAIS, 2012).

No experimento de Casanovas *et al.* (2002), observou-se que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* via sementes aumentou o volume de raízes em experimento realizado em casa de vegetação com adição de adubo nitrogenado, embora, no presente estudo, isso não tenha ocorrido.

Ocorrem também resultados não significativos em trabalhos com *Azospirillum sp.* Verona *et al.* (2010) relataram resultados não significativos para as variáveis altura, massa seca de raiz para as plantas de milho que foram inoculadas via semente em experimento conduzido em casa de vegetação, sendo que o experimento não apresentou doses de adubo nitrogenado.

Diferentemente do estudo, experimento realizado por Milléo *et al.* (2016) apresentou resultados positivos em experimento realizado em campo, quando foi usada inoculação via sementes de *Azospirillum brasiliense* associada ao adubo nitrogenado, para massa seca de raízes. Sendo o volume de raiz relacionado com as raízes e a massa seca de raízes também, esse parâmetro, no estudo, teve resultados não significativos.

**Tabela 9:** Valores obtidos de massa seca de folhas (MSF) em gramas e massa seca do colmo (MSC) em gramas

Tratamentos	MSF	MSC
Controle	6,818b	6,830a
Somente Nitrogênio	9,316ab	12,684a
Azos via semente	6,948b	9,782a
Azos via foliar	6,858b	9,688a
Nitrogênio + Azos via semente	10,874a	9,994a
Nitrogênio + Azos via foliar	10,838a	11,360a
CV(%)=	20,23	44,88
DMS=	6,818b	9,166

Observação: médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Os resultados de massa seca de folhas foram significativos pelo teste Tukey a 5%, já os resultados de massa seca do colmo apresentaram-se não significativos.

Os melhores resultados foram os tratamentos contendo adubação nitrogenada associada ao produto Azos® via semente, seguidos do tratamento contendo adubação nitrogenada juntamente com o produto Azos® via foliar.

O resultado se justifica pela combinação entre os hormônios de crescimento excretados pelo *A. brasiliense*, com a disponibilidade de nitrogênio ideal para o solo, sendo assim, havendo um caso de sinergismo com o nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

Houve resultados significativos para massa seca de parte aérea, em experimento realizado por Aosani *et al.* (2018), com o uso de *Azospirillum brasiliense* via sementes na cultura do milho, associado ao nitrogênio realizado em campo.

Experimento realizado por Quadros *et al.* (2014) para parâmetro de massa seca apresentou resultado significativo também na inoculação via sementes em experimento realizado no campo, com ausência de nitrogênio. Seu resultado foi associado à produção de fitormônios da bactéria; além disso, há relatos de outros autores, em que houve o aumento do número de raízes, o que poderia estar aumentando a retenção de nutrientes e água pelas plantas.

Em contrapartida, um experimento realizado por Silva (2013), com o uso de *A. brasiliense* em inoculação de sementes em experimento conduzido em casa de vegetação em tratamentos associados com nitrogênio e sem nitrogênio, não apresentou resultados significativos para o parâmetro parte aérea.

Em relação à massa seca de colmo, os resultados se apresentaram não significativos.

#### 4 CONCLUSÃO

Os tratamentos que tiveram a inoculação de *Azospirillum brasiliense* via foliar ou via semente associada à adubação nitrogenada apresentaram maiores resultados para altura de plantas, teor de clorofila e massa seca de folhas para estudo cultivado em vaso.

A inoculação via foliar e via sementes associada ao adubo nitrogenado apresentou maiores resultados, comparados aos tratamentos sem adubo nitrogenado.

#### REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. *et al.* Eficiência de fertilizante fosfatado protegido na cultura do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 29-35, 2016.
- ALVES, B. *et al.* Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e da qualidade nutricional. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 45, n. 5, p. 884-891, 2015.
- AOSANI, A. *et al.* Eficiência da inoculação com *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho e adubação nitrogenada. **Unoesc & Ciência**, Joaçaba, v. 9, n. 2, p. 137-146, jun. 2018.
- BRUM, M.S. *et al.* Components of corn crop yield under inoculation with *Azospirillum brasiliense* using integrated crop-livestock system. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 4, p. 485-492, 2016.
- CASANOVAS, E. M. *et al.* *Azospirillum* Inoculation Mitigates Water Stress Effects in Maize Seedlings. **Comunicações de Pesquisa Cereal**, v. 30, p. 343-350, 2002.
- COELHO, A. E. *et al.* Inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* em plantas de milho submetidas à restrição hídrica. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, abr./jun., p. 186-192, 2017.

CONAB. **Acompanhamento de grãos da safra brasileira**, Brasília, v. 7, n. 11, p. 1-31, ago. 2020.

COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. S. F., NAVES, D. C. F.; SANTOS, C. B. S. ROCHA, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasiliense* on the growth and yield of secont-harvest maize, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304-311, 2015.

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B. Nitrogênio em cobertura na cultura do milho em preparo convencional e plantio direto consolidados. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63-70, 2012.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. *In*: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais [...]**. São Carlos: SIB, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. M.; Sintomas de deficiência de macro e micronutrientes de plantas de milho híbrido BRS 1010. **Revista Agro@ambiente On-line**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 74-83, 2012.

FONTOURA, S. M. V.; BAYER, C. Ammonia volatilization in no-till system in the south central region of the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa MG, v. 34, n. 5, p. 1677-1684, 2010.

FREITAS, Isabel Cristina Vinhal; RODRIGUES, Mariana Bueno. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 31, n. 2, p. 143-154, 2010.

GAZOLA, Diego *et al.* Aplicação foliar de aminoácidos e adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho safrinha. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 7, p. 700-707, fev. 2014.

GAZOLA, R. N. *et al.* Efeito residual da aplicação de fosfato monoamônio revestido por diferentes polímeros na cultura de milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 6, p. 876-884, nov./dez. 2013.

GUIMARÃES, V. F. *et al.* Morphophysiological characteristics of maize inoculated cultivated in different types of soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 11, p. 2919-2924, 2014.

GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAYAT, R. *et al.* Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579- 598, 2010.

HUNGRIA, M. *et al.* 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. 1-2, p. 413-425, 2010.

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

KAPPES, Claudinei *et al.* Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, fev. 2013.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995.

MARTINS, F. B. *et al.* Classificação Climática de Köppen e de Thornthwaite para Minas Gerais: cenário atual e projeções futuras. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, n. 1, p. 1-28, nov. 2018.

MILLÉO, R. *et al.* Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum sp.* na cultura do milho. **Scientia Agraria**, v. 17, n. 3, p. 14-23, 2016.

MORAIS, T. P. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MORTATE, R. K. *et al.* Resposta do milho (*Zea mays* L.) à adubação foliar e via solo de nitrogênio. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 5, n. 1, p. 1-6, jan./mar. 2018.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, 1999.

PANDOLFO, C. M. *et al.* Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecu. Catarin**, Florianópolis, v. 27, p. 94-9, 2015.

PEREIRA, F. B. *et al.* Relação entre os caracteres determinantes das eficiências no uso de nitrogênio e fósforo em milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 636-645, set/out. 2013.

QUADROS, P. D. *et al.* Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

RIBEIRO, A. C; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. **5ª Aproximação:** recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. Viçosa, MG: SBCS, 1999.

ROCHA, G. O. *et al.* Chemistry without borders: the energy challenges. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1540-1551, 2013.

ROCKENBACH, M. D. A. *et al.* Eficiência da aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio na cultura do milho. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 6, n. 1, p. 33-44, mar. 2017.

SILVA, Lígia Maria Maraschi da. **Desempenho agrônômico de milho em função do tratamento de sementes com *Azospirillum brasiliense* sob diferentes doses de nitrogênio mineral.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA. **Determinação da capacidade de campo em diferentes tipos de solo.** Juiz de Fora, 2018.

VERONA, D.A. *et al.* **Tratamento de sementes de milho com Zeavit, Stimulate e inoculação com *Azospirillum sp.*** In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais [...].** Goiânia: Associação Brasileira de milho e sorgo, 2010, p. 3731-3737.