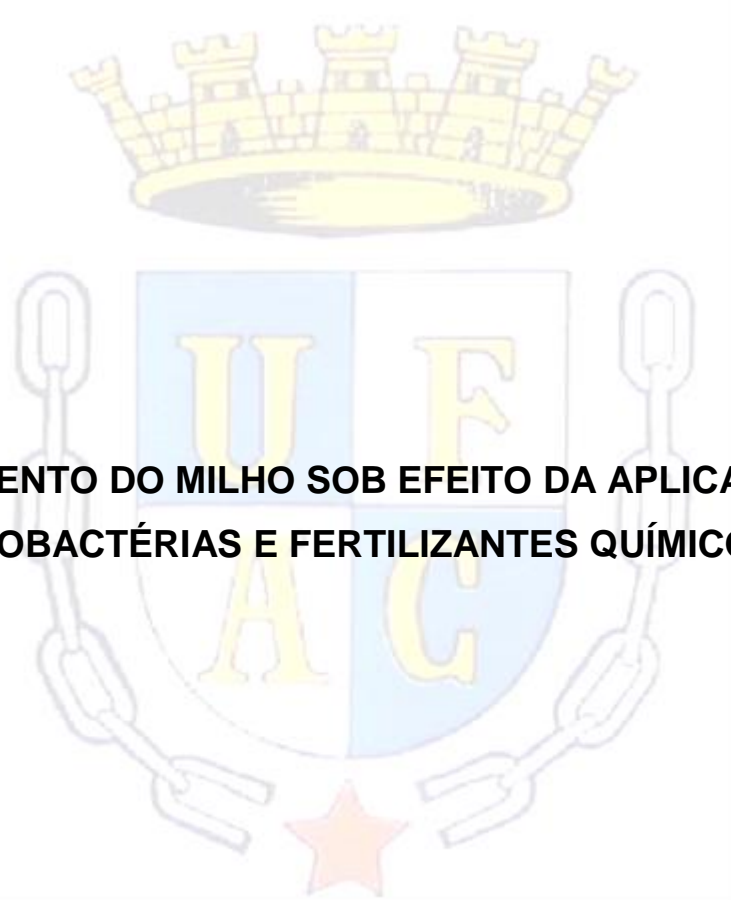


ANDRÉIA DE LIMA MORENO



**CRESCIMENTO DO MILHO SOB EFEITO DA APLICAÇÃO DE
RIZOBACTÉRIAS E FERTILIZANTES QUÍMICOS**

RIO BRANCO - AC

2019

ANDRÉIA DE LIMA MORENO

**CRESCIMENTO DO MILHO SOB EFEITO DA APLICAÇÃO DE
RIZOBACTÉRIAS E FERTILIZANTES QUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ferreira Kusdra

RIO BRANCO - AC

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

M843c Moreno, Andréia de Lima, 1985 -

Crescimento do milho sob efeito da aplicação rizobactérias e fertilizantes químicos / Andréia de Lima Moreno; orientador: Dr. Jorge Ferreira Kusdra. – 2019.

64 f. : ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Rio Branco, 2019.

Inclui referências bibliográficas e apêndices.

1. *Zea mays*. 2. *Azospirillum brasilense*. 3. *Bacillus subtilis*. I. Kusdra, Jorge Ferreira (orientador). II. Título.

CDD: 630

ANDRÉIA DE LIMA MORENO

**CRESCIMENTO DO MILHO SOB EFEITO DA APLICAÇÃO
DE RIZOBACTÉRIAS E FERTILIZANTES QUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Jorge Ferreira Kusdra

Universidade Federal do Acre

Presidente


Dra. Sandra Tereza Teixeira

Faculdade Meta

Membro


Dra. Angelita Aparecida Coutinho Picazevicz

Instituto Federal de Rondônia

Membro


Dr. Elias Melo de Miranda

Embrapa Acre

Membro


Dr. Sebastião Elviro de Araújo Neto

Universidade Federal do Acre

Membro

RIO BRANCO - AC

2019

*Aos meus amados pais
Diogenes Moreno da Silva (in memoriam) e Maria Helena de Lima
Pelo apoio oferecido em todas as etapas de minha formação acadêmica*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais pela vida.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Jorge Ferreira Kusdra pelo incentivo, disponibilidade e dedicação demonstrados ao longo do meu período de doutoramento. Sinto-me honrada pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos bem como minha visão científica e crítica por meio de seus ensinamentos nas disciplinas de Metodologia Científica, Estatística Experimental e Biologia do Solo. O seu entusiasmo e postura profissional são, sem dúvida, inspiradores e um exemplo a ser seguido.

A Profa. Me. Sandra Albuquerque Lima Ribeiro, ao Prof. Dr. Carrumbert Carioca Fernandes, Me. Guaracy Barbosa dos Santos Maia e Esp. Rui Santana de Menezes por estarem sempre dispostos a contribuir e viabilizar os recursos materiais necessários para a realização das etapas laboratoriais deste trabalho.

A Universidade Federal do Acre e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de dar continuidade à minha formação acadêmica.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

A Ana Paula Morais Menezes pelo apoio nas etapas operacionais deste trabalho.

A Joelton Barata pelo auxílio laboratorial.

Ao incentivo recebido dos sinceros amigos.

Aos membros da banca examinadora por se disporem a ler, avaliar e contribuir para a melhoria da qualidade deste trabalho.

Enfim a todos que, mesmo não tendo seus nomes mencionados, me desejam sucesso e torcem pelo meu êxito pessoal e profissional.

“O essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

As rizobactérias possuem mecanismos de ação diversificados capazes de promover o crescimento vegetal fazendo com que estas se tornem um insumo biológico alternativo aos fertilizantes químicos amplamente utilizados no cultivo das plantas. Em poáceas como o milho, estes microrganismos podem ser aplicados individualmente ou associados aos macro e micronutrientes. Neste sentido, mediante uso isolado e combinado de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, zinco e nitrogênio, os objetivos deste trabalho foram aumentar o crescimento do milho, ampliar os benefícios derivados da inoculação das rizobactérias, melhorar a eficiência da fixação biológica do nitrogênio e potencializar o efeito da adubação nitrogenada na semeadura. Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação, ambos no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, utilizando-se como planta teste o milho variedade AL Bandeirante. No primeiro, os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 2 x 2 x 2 considerando a ausência e presença de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e zinco nas sementes e adição ou não de nitrogênio ao solo. No segundo, os tratamentos foram distribuídos em esquema fatorial 2 x 2 x 2 sendo aplicação ou não de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas e adição ou não de nitrogênio ao solo. As variáveis avaliadas em ambos experimentos 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. Verificou-se que a massa total do milho foi aumentada quando se efetua a adubação nitrogenada do solo ou a aplicação de zinco nas sementes. O incremento desta variável também foi obtido na ausência de *Bacillus subtilis* e presença de zinco. A coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* na ausência de nitrogênio se mostrou eficiente em aumentar o diâmetro do colmo do milho e a quantidade deste elemento acumulada nas plantas. *Bacillus subtilis* na ausência de *Azospirillum brasilense* potencializou o efeito da adubação nitrogenada em incrementar o nitrogênio acumulado na parte aérea. A inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas não intensificou o efeito da adubação nitrogenada, mas apresentou resposta similar a esta para o crescimento das plantas. Observou-se também que a adubação nitrogenada de 30 kg.ha⁻¹ na semeadura contribuiu para incrementar o crescimento do milho AL Bandeirante.

Palavras-chave: *Zea mays*. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus subtilis*. Nitrogênio. Zinco.

ABSTRACT

Rhizobacteria have multiples mechanisms of action able to promote vegetal growth making them become a biological alternative to chemical fertilizers widely used in plant cultivation. For Poaceae such as maize, these microorganisms can be applied individually or associated with macro and micronutrients. In this sense, considering the isolated and combined use of *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, zinc and nitrogen, the objectives of this research were to increase maize growth, extend the benefits derived from rhizobacteria inoculation, improve biological nitrogen fixation efficiency and potentiate the effect of nitrogen fertilization at sowing. Two experiments were carried out under greenhouse conditions, both in a completely randomized design, with six replicates, using maize variety AL Bandeirante. In the first one, treatments were arranged in a factorial scheme 2 x 2 x 2 x 2 considering the absence and presence of *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* and zinc in the seeds and addition or not of nitrogen to the soil. For the second, treatments were distributed in a 2 x 2 x 2 factorial scheme with or without inoculation of *Azospirillum brasilense* in the seeds and/or leaves and addition or not of nitrogen to the soil. The analyzed variables were plant height, basal stem diameter, dry biomass of leaves, stem, shoots, roots, total and N accumulated in the shoots. It was verified that total biomass of maize was increased with nitrogen fertilization of soil or when zinc application was performed in the seeds. Increase of this variable was also obtained in absence of *Bacillus subtilis* and presence of zinc. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus subtilis* in the absence of nitrogen was efficient in increasing maize stem diameter and the amount of this element accumulated in plants. Inoculation of *Azospirillum brasilense* in seeds and/or leaves did not intensify the effect of nitrogen fertilization but produced a similar response for plant growth. It was also observed that nitrogen fertilization at dose of 30 kg.ha⁻¹ at sowing contributed to increase the growth of maize variety AL Bandeirante.

Key-words: *Zea mays*. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus subtilis*. Nitrogen. Zinc.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Massa das folhas secas (g) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense* e zinco 30
- Tabela 2 - Massas do colmo e total da planta seca (MCS e MTPS) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Bacillus subtilis* e zinco 30
- Tabela 3 - Massas da parte aérea e total da planta seca (MCS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante em função da interação entre zinco e nitrogênio 32
- Tabela 4 - Diâmetro basal do colmo (mm) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio 33
- Tabela 5 - Nitrogênio acumulado na parte aérea (mg) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio 34
- Tabela 6 - 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 35
- Tabela 7 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), independente de 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 36
- Tabela 8 - 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 37
- Tabela 9 - 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 38

Tabela 10 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação ou não de <i>Azospirillum brasilense</i> (<i>Ab</i>), considerando sua forma de aplicação, com ou sem adubação nitrogenada (AN) do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante	38
Tabela 11 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de <i>Azospirillum brasilense</i> (<i>Ab</i>), independente de 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	39
Tabela 12 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de <i>Azospirillum brasilense</i> (<i>Ab</i>) 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	39
Tabela 13 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> nas sementes ou folhas, independente da adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante	40

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A – Normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas, do colmo, da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MFS, MCS, MPAS, MRS, MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante avaliadas no experimento 1 55
- APÊNDICE B – Normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas, do colmo, da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MFS, MCS, MPAS, MRS, MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante avaliadas no experimento 2 55
- APÊNDICE C – Análise de variância das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas e do colmo secos (MFS e MCS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1 56
- APÊNDICE D – Análise de variância das variáveis massa da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MPAS, MRS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1 57
- APÊNDICE E – Desdobramento da análise de variância da variável diâmetro basal do colmo do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação tripla dos fatores *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio 58
- APÊNDICE F – Desdobramento da análise de variância da variável massa das folhas secas do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores *Azospirillum brasilense* e zinco 58
- APÊNDICE G – Desdobramento da análise de variância da variável massa do colmo seco do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores *Bacillus subtilis* e zinco 59

APÊNDICE H – Desdobramento da análise de variância das variáveis massa da parte aérea e total das plantas secas (MPAS e MTPS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores <i>Bacillus subtilis</i> e zinco	59
APÊNDICE I – Desdobramento da análise de variância das variáveis massa da parte aérea e total das plantas secas (MPAS e MTPS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores zinco e nitrogênio	59
APÊNDICE J – Desdobramento da análise de variância da variável nitrogênio acumulado na parte aérea do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores zinco e nitrogênio	60
APÊNDICE K – Desdobramento da análise de variância da variável nitrogênio acumulado na parte aérea do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação tripla dos fatores <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e nitrogênio	60
APÊNDICE L – Análise de variância das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massas das folhas e do colmo secos (MFS e MCS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 2	61
APÊNDICE M – Análise de variância das variáveis massa da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MPAS, MRS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 2	61
APÊNDICE N – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação e não de <i>Azospirillum brasilense</i> , independente de 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	62
APÊNDICE O – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação e não de <i>Azospirillum brasilense</i> , 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	62

- APÊNDICE P – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense*, 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 62
- APÊNDICE Q – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense*, considerando 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 63
- APÊNDICE R – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, independente de 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 63
- APÊNDICE S – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, 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 64
- APÊNDICE T – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes ou nas folhas, independente da adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante 64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 MILHO	17
2.2 NITROGÊNIO	18
2.3 <i>Azospirillum brasilense</i>	19
2.4 <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.5 ZINCO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 EXPERIMENTO 1	26
3.2 EXPERIMENTO 2	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 EXPERIMENTO 1	30
4.2 EXPERIMENTO 2	35
5 CONCLUSÕES	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	54

1 INTRODUÇÃO

No cultivo do milho (*Zea mays*) a adubação química nitrogenada constitui-se como a principal prática de manejo utilizada tanto na semeadura quanto em cobertura para suprir a demanda de nitrogênio das plantas e que, normalmente, contribui para aumentar os custos econômico, operacional e ambiental vinculados à cultura. Os problemas relacionados ao uso desta fonte nutricional devem-se aos altos preços dos fertilizantes, a extensão das áreas de produção, o baixo aproveitamento pelas plantas, as perdas por volatilização e lixiviação e os riscos de ocasionar desequilíbrios ecológicos pela poluição e contaminação de recursos hídricos. Neste sentido, faz-se necessária a busca por alternativas capazes de potencializar o efeito da adubação nitrogenada e/ou reduzir a quantidade aplicada na cultura, contribuindo assim para otimizar o uso do elemento, reduzir suas perdas para o ambiente e aumentar a disponibilidade do mesmo para as plantas.

Tendo em vista que 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, a utilização de inoculantes biológicos comerciais à base deste microrganismo diazotrófico pode viabilizar a disponibilização para as plantas do elemento biologicamente fixado. Todavia, para o milho, o inoculante pode potencializar o crescimento e a produção da cultura em função da síntese de fitormônios e da solubilização de nutrientes (DÍAZ-ZORITA et al., 2015), mas não substituir a necessidade da adubação química nitrogenada uma vez que a demanda pelo nitrogênio é atendida apenas de forma parcial pela atividade diazotrófica da rizobactéria (HUNGRIA, 2011). Assim, a inoculação das sementes e/ou das folhas com *Azospirillum brasilense*, combinada ao uso de nitrogênio por ocasião da semeadura, em que são aplicadas pequenas quantidades deste elemento ao solo, pode contribuir para reduzir ou até mesmo evitar a necessidade de adubação em cobertura que demanda maior quantidade deste insumo. Além disso, os possíveis efeitos de *Azospirillum brasilense* não se restringem apenas ao nitrogênio biologicamente fixado pois esta espécie atua também como promotora do crescimento de plantas.

Benefícios para o crescimento e melhoria do desempenho produtivo das plantas também têm sido verificados com o uso de *Bacillus subtilis*, embora a finalidade e o mecanismo de ação atribuídos a este microrganismo seja principalmente promover controle biológico de fitopatógenos (BORRIS, 2011). A atividade desta espécie

microbiana como rizobactéria promotora do crescimento vegetal caracteriza-se pela síntese de hormônios vegetais, solubilização de fósforo e produção de sideróforos ao colonizar a região rizosférica das plantas (AHEMAD; KIBRET, 2014). O *Bacillus subtilis* utilizado isoladamente (ARAUJO, 2008) ou combinado a *Azospirillum brasilense* (MAZZUCHELLI et al., 2014) e à adubação nitrogenada (LIMA et al., 2011) tem contribuído para aumentar o crescimento e/ou rendimento do milho indicando que a possibilidade de uso combinado de duas ou mais espécies de rizobactérias associado ou não a fertilizantes químicos pode constituir-se em alternativa biotecnológica promissora para fins de produção vegetal.

No sentido de melhorar o desempenho agrônômico do milho é importante que o suprimento de nutrientes seja efetuado desde seus estádios iniciais de desenvolvimento, pois mesmo que nestes não sejam grandes as demandas, a alta concentração nutricional na zona radicular é benéfica para a obtenção de plantas vigorosas e precoces. Neste contexto, o zinco é um micronutriente que pode ser incorporado à adubação juntamente com os macronutrientes convencionalmente aplicados por ocasião da semeadura. A possibilidade de combinar o uso deste elemento a outras fontes químicas e/ou biológicas capazes de aumentar o crescimento e produção das plantas, sem comprometer suas funções individuais, mas sim promovendo efeito sinérgico dos mesmos, é interessante do ponto de vista nutricional e produtivo.

Como já foram evidenciados para a cultura do milho efeitos isolados derivados de nitrogênio (ANDRADE et al., 2014; SCHIAVINATTI et al., 2011), zinco (PRADO et al., 2007; PREETHA; STALIN, 2014), *Azospirillum brasilense* (MARINI et al., 2015; QUADROS et al., 2014) e *Bacillus subtilis* (ARAUJO, 2008) o presente trabalho, mediante combinação de fontes químicas (nitrogênio e zinco) e biológicas (*Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*), tem como objetivos aumentar o crescimento das plantas, ampliar os benefícios derivados da inoculação das sementes com as rizobactérias, melhorar a eficiência da fixação biológica do nitrogênio e potencializar o efeito da adubação nitrogenada na semeadura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O milho constitui uma das principais matérias primas utilizadas na composição de grande variedade de produtos da alimentação humana e animal. Devido a versatilidade de usos tanto da parte aérea e, principalmente, dos grãos, a cultura destaca-se na agricultura mundial e brasileira pelo alto potencial econômico que representa para os produtores (CONAB, 2017).

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 (FERNANDES et al., 2008). Porém, problemas relacionados a baixa eficiência de aproveitamento pelas plantas, ao alto custo deste insumo e aos prejuízos ambientais decorrentes de sua utilização, têm sido considerados na busca por alternativas que viabilizem a redução da quantidade utilizada e potencializem seu efeito no aumento do crescimento e da produção do milho (HUNGRIA, 2011).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, também denominadas como RPCPs, constituem um grupo de microrganismos com reconhecido potencial de produzir respostas benéficas por meio de uma relação associativa estabelecida, em geral, mediante colonização do sistema radicular de diferentes espécies vegetais. Os mecanismos de ação normalmente reportados para estes organismos incluem a fixação biológica do nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de macro e micronutrientes e controle de fitopatógenos. Neste sentido, estas já vêm sendo utilizadas como insumo agrícola alternativo aos fertilizantes químicos, especialmente os nitrogenados, visando reduzir os custos de produção das culturas e minimizar os impactos que os mesmos representam ao ambiente (GARCIA et al., 2017; GRAÇAS et al., 2015; SOUZA et al., 2015).

As rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* podem se constituir em opção para reduzir a quantidade aplicada e/ou potencializar o efeito de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho (DARTORA et al., 2016; LIMA et al., 2011; PICAZEVICZ et al., 2017). Além disso, a possibilidade de uso combinado de fontes biológicas (microrganismos) e químicas (macro e micronutrientes) na agricultura moderna, amplia as perspectivas de busca por alternativas econômicas e ambientalmente viáveis para problemas relacionados a produção agrícola (HUNGRIA et al., 2010; HUSSAIN et al., 2015; LANA et al., 2012; MAZZUCHELLI et al., 2014).

2.1 MILHO

Botanicamente o milho pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Cyperales, família Poaceae, sub-família Panicoideae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* (CRONQUIST, 1981). É uma planta herbácea constituída de um caule ereto do tipo colmo, geralmente não ramificado, com nós espaçados que dá suporte às folhas e as partes florais. As raízes são fasciculadas, do tipo primária e adventícia, estando presentes em sua maioria nos primeiros 30 cm de profundidade do solo. As folhas são longas e estreitas, constituídas de limbo verde escuro, lanceolado, com bordas serrilhadas, nervura central vigorosa, bainha invaginante, pilosa e verde clara. As sementes são do tipo cariopse, constituídas de pericarpo, endosperma e embrião. A planta é monóica, apresentando órgãos masculinos e femininos no mesmo indivíduo, porém localizados em estruturas distintas: o pendão agrupado na panícula situada no limite superior e a espiga nas axilas do colmo. Em geral apresenta polinização cruzada sendo, portanto, alógama (BARROS; CALADO, 2014; MAGALHÃES et al., 1996; PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

O ciclo da planta de milho é dividido em duas fases, representadas por distintos estádios fenológicos. A germinação e emergência (VE), primeira até a décima oitava folha (V1 a V18) e pendoamento (VT) constituem-se como etapas características da fase vegetativa. O florescimento (R1), desenvolvimento de grãos (R2 a R5) e a maturação fisiológica (R6) compreendem as etapas correspondentes à fase reprodutiva. A duração de cada estágio fenológico e, conseqüentemente, das fases vegetativa e reprodutiva, é variável e definida de acordo com o genótipo, hábito de crescimento das plantas e com as condições edafoclimáticas do ambiente de cultivo (RITCHIE et al., 2003).

As principais características que influenciam as variações existentes para a duração do ciclo da cultura do milho são as diferentes variedades e cultivares da espécie, época de semeadura, condições climáticas e tipos de solo. No Brasil o período de cultivo compreendido entre a semeadura e a maturação fisiológica varia entre 110 a 180 dias, tendo as cultivares do Grupo I o ciclo precoce com menos de 110 dias da semeadura à colheita, as do Grupo II o ciclo médio entre 110 e 145 dias e as do Grupo III o ciclo tardio com mais de 145 dias (MAGALHÃES; DURÃES, 2006; MAPA, 2015).

O milho é considerado uma planta com alta demanda por nutrientes e, apesar de apresentar baixo nível de absorção destes no início do seu desenvolvimento, há intensa necessidade dos mesmos na fase vegetativa, entre os estádios V12 e VT, e

na fase reprodutiva, entre os estádios R2 a R5 (COELHO, 2006; KARLEN et al., 1987, 1988). As plantas obtêm os nutrientes da matéria orgânica presente no solo e da adubação química aplicada, com exceção do nitrogênio que, além destas duas fontes, pode ser obtido por fixação biológica por meio da associação com bactérias diazotróficas, pertencentes principalmente ao gênero *Azospirillum* (CANTARELLA; DUARTE, 2004; FIGUEIREDO et al., 2009).

2.2 NITROGÊNIO

Em sistemas produtivos destinados ao cultivo agrícola, o nitrogênio é considerado macronutriente essencial para garantia do adequado desempenho agrônômico de diferentes espécies vegetais. As fontes naturais deste elemento no solo são a matéria orgânica e o ar atmosférico, mas para que possam ser utilizadas pelas plantas são requeridas transformações por diferentes grupos de organismos. Os processos de mineralização (mediada por microrganismos decompositores e nitrificantes) e fixação biológica (realizada por bactérias diazotróficas) constituem as formas pelas quais ocorre a biodisponibilização de nitrogênio para as plantas. Todavia, como estes mecanismos, normalmente, não são capazes de possibilitar o suprimento de nitrogênio ao longo de todo o ciclo das culturas, a utilização de adubos químicos nitrogenados torna-se necessária para garantir a viabilidade econômica dos sistemas de produção (LEGHARI et al., 2016; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2008).

Os teores de nitrogênio em solos brasileiros normalmente são baixos variando de 0,05% a 0,30% e, por estarem principalmente na forma orgânica, a disponibilização deste elemento para as plantas depende da mineralização realizada por meio de processos mediados por microrganismos decompositores. Desta forma, os fertilizantes nitrogenados são geralmente empregados no cultivo agrícola uma vez que representam uma fonte de N em forma prontamente utilizável pelas plantas sendo esta obtida de reservas naturais não renováveis por meio da fixação industrial (CARMO et al., 2012; FERNANDES et al., 2008). Contudo, o nitrogênio na forma de fertilizante apresenta baixa eficiência de aproveitamento pelas plantas e implica na produção de excedentes residuais (NH_4 , NO_3 , N_2O) com alto potencial de poluição para o ambiente (CARVALHO; ZABOT, 2012).

Entre os nutrientes requeridos pelas plantas o nitrogênio é considerado o mais dependente de transformações microbianas. Além disso, é um elemento que apresenta

comportamento dinâmico por possuir variadas formas no solo (N orgânico, N₂, NH₃, NH₄, NO₃, NO₂, N₂O) e, também, diversos processos responsáveis por sua entrada (fixação biológica, decomposição da matéria orgânica, fertilizantes químicos) e saída (desnitrificação, volatilização da amônia, lixiviação do nitrato, extração pelas culturas) do mesmo (CANTARELLA, 2007; ROSOLEM et al., 2003; SANGOI et al., 2003).

A principal fonte de fertilizante nitrogenado utilizada no cultivo de plantas de interesse agrônômico é a ureia devido à maior concentração de N (46%) em relação ao nitrato (32%) e sulfato de amônio (20%), além da ampla disponibilização no mercado e do custo relativamente menor (CANTARELLA; DUARTE, 2004). A demanda do milho por este elemento ocorre praticamente durante todo o ciclo da cultura, tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva. Desta forma, este é aplicado na semeadura e/ou em cobertura, geralmente de forma parcelada, considerando-se a sincronização com os períodos de maior necessidade nutricional das plantas (BIESDORF et al., 2016; GOTT et al., 2014; SCHIAVINATTI et al., 2011).

O nitrogênio é o nutriente que, além de fundamental para o crescimento e desenvolvimento do milho é, também, o que apresenta efeitos mais significativos no aumento de produtividade da cultura. A importância deste elemento para o suprimento nutricional das plantas é justificável por este participar da manutenção da estrutura e funções celulares e de reações enzimáticas. Além disso, é constituinte básico de proteínas e da clorofila estando, portanto, diretamente envolvido na fotossíntese. Desta forma, é essencial que pequenas doses deste nutriente já sejam disponibilizadas nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (FERREIRA, 2012; OKUMURA et al., 2011).

Considerando os benefícios para a agricultura e os prejuízos para o ambiente derivados dos fertilizantes nitrogenados, há necessidade de definição de estratégias que minimizem seu uso e/ou aumentem sua eficiência de forma que o efeito de doses menores possa ser equivalente ao de maiores no crescimento e produção das plantas. Uma das possibilidades é a intensificação do uso de microrganismos diazotróficos nos sistemas de produção agrícola (GOUDA et al., 2018; JONES et al., 2014).

2.3 *Azospirillum brasilense*

A rizobactéria *Azospirillum brasilense* é um microrganismo diazotrófico não simbiótico de vida livre que se associa a poáceas como milho, trigo, sorgo, arroz, cana

de açúcar e utiliza os materiais orgânicos secretados pelas mesmas como fonte nutricional para manutenção de seu metabolismo. A interação da mesma é, em geral, estabelecida no sistema radicular das plantas devido ao acúmulo de células, tecidos, mucilagens e exsudatos que contêm proteínas, carboidratos, vitaminas e hormônios no entorno desta estrutura que estimulam a colonização bacteriana (BURDMAN et al., 2000; REIS et al., 2006).

O mecanismo de ação desta rizobactéria mais diretamente relacionado com a promoção do crescimento das plantas é a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Porém, a síntese de hormônios vegetais, solubilização de fósforo e produção de sideróforos são atividades também atribuídas a *Azospirillum brasilense*. Esta espécie microbiana tem sido utilizada como insumo biológico para fins agrícolas e, neste sentido, pode contribuir para reduzir o custo ambiental que representa todo o sistema de síntese, aplicação e destino dos fertilizantes nitrogenados (BALDANI et al., 1997; DOBBELAERE et al., 2003; MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

O nitrogênio fixado por microrganismos associativos como *Azospirillum brasilense* é disponibilizado lentamente e em pequena quantidade para as plantas uma vez que parte deste nutriente é imobilizada e empregada na manutenção do metabolismo microbiano. Em contrapartida, quantidades significativas de nitrogênio são mineralizadas após a morte das células bacterianas. No entanto, este processo é considerado pouco eficiente se comparado a fixação promovida por bactérias simbióticas em que o nitrogênio é prontamente disponibilizado à planta sob a forma de amônia que se combinará com os ácidos orgânicos provenientes da fotossíntese na formação dos aminoácidos (HUNGRIA, 2011; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica do nitrogênio por *Azospirillum brasilense* em associação com poáceas contribui com parte das necessidades das plantas por este nutriente (PICCININ et al., 2015). Todavia, benefícios adicionais podem ser derivados desta rizobactéria pelo fato de atuar também como promotora do crescimento de plantas 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; BASHAN, 2010).

Considerando que a rizobactéria, em função de estabelecer uma relação apenas associativa com o milho, dificilmente disponibilizará ao mesmo a quantidade de nitrogênio necessária para atender a demanda da planta por este elemento, recomenda-se que

o microrganismo não seja aplicado isoladamente, mas sim combinado com o fertilizante nitrogenado na semeadura e/ou em cobertura (HUNGRIA et al. 2010). Dartora et al. (2016) verificaram, por exemplo, que a inoculação de *Azospirillum brasilense* associada com 30 kg.ha⁻¹ de nitrogênio por ocasião da semeadura do milho proporcionou incrementos para o crescimento das plantas equivalente a aplicação de 160 kg.ha⁻¹ deste elemento, considerando semeadura (30 kg.ha⁻¹) mais cobertura (130 kg.ha⁻¹). Já Mumbach et al. (2017) verificaram que mediante a adição da mesma dose combinada a rizobactéria a produtividade da cultura foi similar a verificada com a adição de 120 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, também parcelado entre semeadura (30 kg.ha⁻¹) e cobertura (90 kg.ha⁻¹).

No milho os produtos biológicos 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). Todavia, 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, condições heterogêneas de fertilidade, temperatura, umidade e competição com bactérias nativas, além do contato direto com os defensivos químicos utilizados para o 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 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). Por outro lado, o uso de *Azospirillum brasilense* não garante que serão obtidos efeitos significativos e/ou verificáveis no crescimento, produção e rendimento do milho (PANDOLFO et al., 2014; REPKE et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2016). Neste sentido, o que tem sido buscado é associar esta rizobactéria a outros microrganismos promotores do crescimento vegetal visando aumentar sua eficiência diazotrófica, reduzir e/ou otimizar o uso de fertilizante nitrogenado bem como melhorar o aproveitamento de nutrientes presentes e/ou adicionados ao solo (ARAÚJO et al., 2015; DARTORA et al., 2013; INAGAKI et al., 2014; MARKS et al., 2015; MAZZUCHELLI et al., 2014).

2.4 *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* é um microrganismo de vida livre que ocorre naturalmente em solos com características físicas e químicas variadas como, também, colonizando a região rizosférica de diferentes espécies vegetais. Esta rizobactéria, assim como outras pertencentes ao gênero *Bacillus*, apresenta grande potencial biotecnológico para a agricultura sendo seu uso considerado principalmente para o controle de organismos fitopatogênicos e, de forma secundária, como promotora do crescimento de plantas (BORRISS, 2011; LYNGWI; JOSHI, 2014).

O crescimento vegetal promovido por *Bacillus subtilis* é resultante de diferentes atividades realizadas por estas rizobactérias tais como solubilização de nutrientes, produção de fitormônios e metabólitos de ação fungicida/bactericida, mediante o estabelecimento de uma relação associativa deste microrganismo com plantas por meio da colonização da superfície radicular e/ou entre as células do córtex da raiz. Os efeitos benéficos de *Bacillus subtilis* na melhoria do desempenho agrônômico das culturas são derivados principalmente da síntese de ácido indolacético (AIA), solubilização de fósforo, zinco e produção de sideróforos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CHOUDHARY; JOHRI, 2009; KUMAR et al., 2011; MUMTAZ et al., 2017).

Embora os mecanismos de ação de *Bacillus subtilis* não estejam diretamente relacionados à fixação biológica do nitrogênio, o uso desta rizobactéria, de forma isolada ou combinada a outros microrganismos, visando otimizar o aproveitamento deste nutriente por fabáceas nodulíferas e poáceas que se beneficiam deste processo, tem se constituído em alternativa promissora para melhorar o aproveitamento do N atmosférico (FIGUEIREDO et al., 2011). Araujo (2008) verificou incrementos na altura e teor de nitrogênio do milho derivados da inoculação de *Bacillus subtilis* nas sementes com a planta cultivada em solo sem adição de fertilizante nitrogenado. Lima et al. (2011) observaram que *Bacillus subtilis* potencializou o efeito do fertilizante nitrogenado aplicado no milho. Em cultivo de soja, Araujo e Hungria (1999) verificaram que a coinoculação em sementes com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Bacillus subtilis* incrementou a nodulação, o potencial de ocupação dos nódulos pelos rizóbios e o rendimento da cultura.

Tendo em vista que os efeitos produzidos por *Bacillus subtilis* nas plantas são derivados de mecanismos de ação diversificados que incluem produção de fitormônios

vegetais, solubilização de nutrientes e controle de fitopatógenos, não é possível determinar especificamente qual destes contribui em maior ou menor proporção para incrementar o crescimento e produção vegetal, sendo possível considerar, portanto, que estes ocorrem simultaneamente (BORRISS, 2011). O aumento do crescimento radicular das plantas e a redução de microrganismos deletérios na região da rizosfera das mesmas, proporcionados por *Bacillus subtilis*, pode resultar em maior aproveitamento de nutrientes (N, P, Zn) do solo e também contribuir para melhorar a eficiência diazotrófica de rizobactérias como *Azospirillum brasilense* sendo estes efeitos refletidos no incremento de variáveis relacionadas ao crescimento e produção das culturas (ATIENO et al., 2012; ELKOCA et al., 2010; KUAN et al., 2016; MAZZUCHELLI et al. 2014; MUMTAZ et al., 2017; TRAORÉ et al., 2016).

A influência de *Bacillus subtilis* seja para incrementar o crescimento das plantas e/ou produção das culturas, aumentar os teores de nutrientes no tecido vegetal, potencializar o aproveitamento do nitrogênio atmosférico e/ou controlar a atividade de microrganismos fitopatogênicos depende, basicamente, do quão expressiva é a relação estabelecida entre planta e microrganismo, sendo esta condicionada às características individuais de cada espécie, do solo e clima do ambiente de cultivo (FIGUEIREDO et al., 2011). Os múltiplos benefícios produzidos por esta rizobactéria nas plantas já foram verificados em trabalhos com milho (ARAUJO, 2008), soja (ARAÚJO et al., 2005), feijoeiro (ELKOCA et al., 2010), trigo (PISHCHIK et al., 2015), alface (ARKHIPOVA et al., 2005) e tomateiro (CABRA CENDALES et al., 2017).

2.5 ZINCO

Os solos tropicais apresentam normalmente baixa concentração de zinco devido ao material de origem dos mesmos ser deficiente neste elemento e, além disso, práticas inadequadas de calagem e de adubação fosfatada, estão diretamente relacionadas à indisponibilidade deste micronutriente para as plantas e, como consequência, comprometem o desempenho produtivo das culturas (CONSOLINI; COUTINHO, 2004; DAVIES, 1997; SADEGHZADEH, 2013). Desta forma, para atender a demanda de zinco pelas plantas este elemento é disponibilizado via adubação podendo ser aplicado nas sementes, adicionado a lanço no solo ou no sulco da semeadura, pulverizado nas folhas e também por fertirrigação (COELHO, 2006; PRADO et al., 2007, 2008; PUGA et al., 2013; SILVA et al., 2008).

As deficiências nutricionais relacionadas ao zinco na cultura do milho foram inicialmente observadas por Barnette et al. (1936) em plantas cultivadas na Flórida. Porém, a comprovação de que este micronutriente é essencial para o adequado crescimento e desenvolvimento de plantas superiores ocorreu em 1919 em experimentos utilizando solução nutritiva (THORNE, 1957). No Brasil, a importância deste elemento na produção do milho foi verificada mediante observação de deficiência generalizada do mesmo em solos sob vegetação de cerrado (BÜLL, 1993; GALRÃO, 1994, 1995, 1996).

O zinco desempenha funções relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatos e também está associado à formação de auxinas (BROWN et al., 1993). Dentre as consequências da carência deste micronutriente nas plantas de milho estão enraizamento superficial, clorose acentuada na nervura foliar principal, encurtamento dos entrenós, menor formação de estruturas foliares, tons arroxeados nas folhas e no colmo, além de redução no crescimento, má formação de espigas e também baixa produção de grãos (ALLOWAY, 2008; PRADO, 2008).

Para o cultivo do milho, quando o teor de zinco disponível no solo está abaixo de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, recomenda-se que seja efetuada a adubação e, como a quantidade deste elemento requerida pelas plantas é relativamente baixa ($1,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de solo), a adição de pequenas quantidades deste ao solo ($2 \text{ a } 4 \text{ kg.ha}^{-1}$) de forma homogênea torna-se operacionalmente difícil (COELHO, 2006). Além disso, dependendo das características químicas (pH, CTC, matéria orgânica, cátions e ânions solúveis) e mineralógicas (tipo e teor de argila, óxidos e hidróxidos de Al e Fe) do ambiente de cultivo, a adubação com zinco pode não interferir no crescimento e produção das plantas havendo, ainda, risco de o elemento tornar-se indisponível antes mesmo que estas desenvolvam seu sistema radicular de forma suficiente para aproveitá-lo (GONÇALVES JÚNIOR et al., 2007; JAMAMI et al., 2006; MOUSAVI, 2011; PEREIRA et al., 2007). Neste sentido, a aplicação do zinco nas sementes tem se mostrado como alternativa prática e eficiente por possibilitar distribuição uniforme deste micronutriente na área de cultivo e o aproveitamento do mesmo desde as fases iniciais de desenvolvimento e crescimento do milho evidenciado pelo incremento de teores deste elemento na parte aérea das plantas (DIAS; CICERO, 2016; LEAL et al., 2007; RIBEIRO; SANTOS, 1996).

As principais fontes de zinco utilizadas para adubação da cultura do milho estão na forma de sulfato (ZnSO_4 com 22% de Zn) e óxido (ZnO com 80% de Zn) e estas têm apresentado respostas diferenciadas no desempenho agrônômico do milho

dependendo da sua forma de aplicação (GALRÃO, 1994, 2004). Prado et al. (2007) ao verificarem o efeito de doses (0, 5, 10, 20 e 40 g de Zn.kg⁻¹ de sementes) de óxido e sulfato de zinco aplicados via semente na nutrição e crescimento inicial do milho, observaram que o primeiro contribuiu para o incremento da matéria seca da parte aérea, raiz e total das plantas e o segundo, ao contrário, comprometeu o crescimento e causou toxicidade nas mesmas. Por outro lado, Leal et al. (2007) ao aplicarem sulfato de zinco na dose de 10 g de Zn.kg⁻¹ de sementes, não observaram efeito fitotóxico, mas também não verificaram aumento na massa seca do milho devido ao uso desta fonte. Com a aplicação de sulfato e óxido de zinco tanto nas sementes (4,5 g de Zn.kg⁻¹) quanto no solo (5,3 kg de Zn.ha⁻¹), Rosolem e Ferrari (1998) obtiveram resultados similares, tanto entre fontes quanto formas de aplicação, para altura, diâmetro do colmo e matéria seca da parte aérea e raiz do milho.

Segundo Galvão (1994, 2004) o zinco pode ser melhor aproveitado pelas plantas quando aplicado como sulfato no solo e/ou na parte aérea e na forma de óxido nas sementes. Todavia, respostas diferenciadas no crescimento e rendimento do milho referentes às fontes e aos métodos de aplicação não foram obtidas por Prado et al. (2008) e Galvão (1996) ao aplicarem sulfato de zinco no solo e na parte aérea das plantas e óxido de zinco nas sementes. Porém, independente da fonte e da forma de aplicação utilizada, efeitos positivos da adubação com zinco já foram verificados para o milho (GALRÃO, 1994; PRADO et al., 2007; PREETHA; STALIN, 2014; SHAHAB et al., 2016; TARIQ et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados paralelamente dois experimentos em casa de vegetação, localizada na área experimental da Universidade Federal do Acre, em Rio Branco, Acre, no período de fevereiro a abril de 2017, utilizando-se como planta teste o milho variedade AL Bandeirante.

3.1 EXPERIMENTO 1

O experimento foi instalado seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 2$, considerando-se como fatores *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, zinco e nitrogênio, todos estes com dois níveis sendo, aplicação ou não das bactérias e de zinco nas sementes e adição ou não de nitrogênio ao solo. Para cada um dos 16 tratamentos combinados foram consideradas seis repetições, totalizando 96 unidades experimentais constituídas por tubos de PVC de cor branca, com diâmetro de 200 mm, altura de 50 cm e volume de $15,7 \text{ dm}^3$. Nestas, foi adicionado solo com característica granulométrica argilosa (427 g.kg^{-1} de argila, 227 g.kg^{-1} de silte e 346 g.kg^{-1} de areia) retirado da camada superficial (0-20 cm) de uma área em pousio localizada no campus da Universidade Federal do Acre.

Ao ser efetuada a análise química inicial do solo (pH em $\text{CaCl}_2 = 3,7$; matéria orgânica = $41,0 \text{ g.dm}^{-3}$; P = $10,0 \text{ mg.dm}^{-3}$; K = $81,9 \text{ mg.dm}^{-3}$; Ca = $1,7 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Mg = $1,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Al = $1,4 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; H+Al = $7,2 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Soma de bases = $2,9 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; CTC = $10,1 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Saturação por bases = 28,9%), verificou-se a necessidade de elevar a sua saturação de bases, sendo, para esta finalidade, adicionado ao mesmo calcário dolomítico calcinado com PRNT de 100% e aguardado o período de 90 dias para reação do produto. Considerando a condição de trabalho em tubos, com restrita quantidade de solo, para elevar sua fertilidade adicionou-se a este 100 mg.kg^{-1} de P na forma de superfosfato simples (18% de P_2O_5) e 100 mg de K na forma de cloreto de potássio (58% de K_2O), ambos antes da semeadura. Desta forma, os atributos químicos apresentados pelo solo na 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%.

As sementes do milho AL Bandeirante também foram submetidas à análise de sua composição química obtendo-se como resultado as seguintes concentrações: N = 16,7 g.kg⁻¹ ; P = 4,0 g.kg⁻¹ ; K = 5,1 g.kg⁻¹ ; Ca = 0,1 g.kg⁻¹ ; Mg = 1,4 g.kg⁻¹ ; S = 1,4 g.kg⁻¹ ; Fe = 32,1 mg.kg⁻¹ ; Mn = 20,9 mg.kg⁻¹ ; Cu = 2,8 mg.kg⁻¹ ; Zn = 33,3 mg.kg⁻¹ ; Na = 16,5 mg.kg⁻¹ ; B = 1,4 mg.kg⁻¹ ; Al = 9,1 mg.kg⁻¹.

As fontes das rizobactérias foram inoculantes comerciais de formulação turfosa para *Azospirillum brasilense* contendo as estirpes AbV5 e AbV6 e suspensão concentrada para *Bacillus subtilis* composta pelo isolado UFPEDA 764. Para avaliação da qualidade dos produtos biológicos, estimou-se o número mais provável (NMP) de células viáveis dos microrganismos contidas nos mesmos 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). O meio de cultura para *Bacillus subtilis* foi constituído por peptona (5 g), extrato de carne (3 g), ágar (15 g) e água destilada (1 L). A quantidade de células viáveis estimada para *Azospirillum brasilense* foi de 1,5 x 10⁸ por g do inoculante e para *Bacillus subtilis* foi de 6,7 x 10⁸ por mL do inoculante. Os fertilizantes ureia (46% de N) e o óxido de zinco (80% de Zn) foram utilizados como fontes químicas de nitrogênio e zinco, respectivamente.

As doses dos produtos biológicos comerciais e do micronutriente adicionadas por kg de sementes corresponderam a 5 g para *Azospirillum brasilense*, 5 mL de *Bacillus subtilis* e 20 g de zinco. O nitrogênio foi adicionado ao solo no momento da semeadura em quantidade equivalente a 30 kg por hectare. Posteriormente foram semeadas cinco sementes por unidade experimental em profundidade padrão de 3 cm e de forma equidistante. Para garantir maior adesão, permitir melhor distribuição e promover a mistura mais uniforme e homogênea do inoculante turfoso e do óxido de zinco às sementes, estas foram umedecidas com solução açucarada a 10% na dosagem de 12 mL.kg⁻¹ de semente. No caso dos tratamentos contendo *Bacillus subtilis*, de forma isolada ou combinada, para viabilizar a adesão adequada do *Azospirillum brasilense* e do zinco às sementes quando presentes e padronizar a quantidade de líquido aplicada nas mesmas, foi adicionado à dose (5 mL.kg⁻¹ de semente) do produto biológico à base de *Bacillus subtilis*, 7 mL de solução açucarada a 10% por kg de semente.

O desbaste foi realizado no estágio fenológico V3, mantendo-se apenas a planta considerada mais vigorosa por unidade experimental. Efetuaram-se irrigações regularmente e de forma homogênea, sendo utilizada como referência de umidade, 75% da capacidade de campo. Durante o período de condução do experimento 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 °C e 79%.

As avaliações foram efetuadas no estágio VT, quando pelo menos 50% das plantas apresentavam o último ramo do pendão completamente visível. Foram consideradas as seguintes variáveis indicadoras de crescimento da planta: altura, diâmetro do caule, massas das folhas, pendão, colmo, raiz e total secos. As alturas das plantas foram obtidas mediante medição com fita métrica do comprimento vertical do colo ao limite do pendão. O diâmetro do caule foi medido com paquímetro na região basal. Para obtenção das massas vegetais secas, a parte aérea (folhas, colmo, pendão) e radicular foram mantidas em estufa a 65 °C até verificação de valores constantes. Também efetuou-se 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 resultados obtidos foram submetidos à verificação de presença de dados discrepantes (GRUBBS, 1969), normalidade dos erros (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias (BARTLETT, 1937). Posteriormente, verificou-se pelo teste F de Snedecor e Cochran (1948) a significância dos efeitos isolados e/ou combinados de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, zinco e nitrogênio nas variáveis consideradas. No caso de interações significativas ($p < 0,05$) entre dois ou mais fatores foi efetuado o desdobramento da análise de variância considerando o efeito de um fator dentro dos níveis dos demais.

3.2 EXPERIMENTO 2

O experimento foi conduzido de forma similar ao primeiro e igualmente realizado no delineamento inteiramente casualizado. Entretanto, neste, considerou-se o arranjo fatorial do tipo 2 x 2 x 2, uma vez que os fatores utilizados foram *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. Para cada um dos 8 tratamentos

combinados foram consideradas seis repetições, totalizando 48 unidades experimentais as quais apresentaram a mesma característica das utilizadas no experimento anterior, assim como o solo e as sementes.

A fonte do *Azospirillum brasilense* utilizada nas sementes e a do nitrogênio adicionado ao solo, bem como suas respectivas doses e formas de uso foi idêntica à do primeiro experimento. O produto comercial de formulação líquida à base de *Azospirillum brasilense* contendo a estirpe AbV5 e utilizado para aplicação foliar, foi igualmente avaliado quanto à sua qualidade seguindo-se o mesmo procedimento adotado no experimento anterior. A quantidade estimada de células viáveis do microrganismo foi de $5,7 \times 10^8$ por mL do inoculante sendo esta concentração também estabelecida como dose aplicada nas folhas.

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 por borrifada. Desta forma, como a intenção era a de adicionar 1mL do inoculante, foram efetuadas 6 borrifadas do mesmo por planta. As plantas foram acondicionadas em uma câmara de PVC com diâmetro de 200 mm e altura de 50 cm para individualizar a aplicação nas mesmas, evitar a dissipação do produto pelo vento e viabilizar a adesão e a distribuição homogênea do produto biológico nas folhas.

A instalação e condução do experimento, assim como as avaliações das variáveis relacionadas ao crescimento da planta seguiram a mesma metodologia utilizada no anterior. Os procedimentos relacionados à análise estatística dos resultados das variáveis também foram realizados de forma similar ao experimento 1. Porém, neste efetuou-se por 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores considerados como tratamentos nos experimentos 1 e 2 produziram respostas diferenciadas nas variáveis relacionadas ao crescimento do milho AL Bandeirante. Além disso nenhum destes, de forma isolada e/ou combinada, nem tampouco o ambiente experimental comprometeu a germinação das sementes ou emergência e desenvolvimento das plantas.

4.1 EXPERIMENTO 1

O zinco produziu efeito significativo no crescimento do milho quando houve interação deste com *Azospirillum brasilense* (Tabela 1), *Bacillus subtilis* (Tabela 2) e nitrogênio (Tabela 3). A combinação entre os fatores interferiu nas massas das folhas, do colmo, parte aérea e total das plantas, assim como no nitrogênio acumulado na parte aérea das mesmas.

Tabela 1 - Massa das folhas secas (g) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense* e zinco^(1, 2)

<i>Azospirillum brasilense</i>	Zinco		CV (%)
	Ausência	Presença	
Ausência	24,44 Aa	24,15 Ab	11,89
Presença	23,94 Ba	26,30 Aa	

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES A, C e F.

Tabela 2 - Massas do colmo e total da planta seca (MCS e MTPS) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Bacillus subtilis* e zinco^(1, 2)

Variáveis	<i>Bacillus subtilis</i>	Zinco		CV (%)
		Ausência	Presença	
MCS (g)	Ausência	35,77 Aa	38,22 Aa	11,66
	Presença	37,19 Aa	34,90 Ab	
MTPS (g)	Ausência	82,11 Ba	87,48 Aa	10,90
	Presença	85,29 Aa	82,30 Aa	

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES A, C, D, G e H.

As rizobactérias produziram diferentes respostas no incremento das massas das plantas ao serem combinadas com o zinco. *Azospirillum brasilense* promoveu o aumento da massa das folhas somente na presença deste elemento, não havendo, neste caso, efeito significativo quando o microrganismo ou o micronutriente foi aplicado isoladamente nas sementes (Tabela 1). Em contrapartida, *Bacillus subtilis* reduziu a massa do colmo e não interferiu na massa total ao ser utilizado na presença ou ausência de zinco (Tabela 2).

O aumento do potencial de aproveitamento pelas plantas de nutrientes disponibilizados via adubação constitui-se como efeito normalmente reportado para rizobactérias, seja por estes microrganismos estimularem o crescimento das raízes ampliando a possibilidade de absorção de fontes nutricionais ou devido a solubilização de elementos presentes e/ou adicionados ao solo em formas não assimiláveis (DÍAZ-ZORITA et al., 2015; GOTETI et al., 2013; MARINI et al., 2015; PICCININ et al., 2015). O reflexo no incremento da massa das folhas (Tabela 1) derivado da aplicação combinada do zinco com *Azospirillum brasilense* nas sementes pode estar relacionado ao efeito desta bactéria em disponibilizar o elemento mediante tais mecanismos. Modificações na arquitetura radicular (alongamento, produção de raízes laterais e pelos radiculares) são relacionadas com a eficiência de *Azospirillum brasilense* em melhorar o aproveitamento de água e nutrientes pelas plantas em função do aumento da superfície de contato de suas raízes com o solo. Além disso, a acidificação da rizosfera devido a síntese de ácidos orgânicos por esta espécie microbiana contribui para redução do pH do solo adjacente que influencia diretamente na biodisponibilidade do zinco para as plantas.

Bactérias que atuam na solubilização do zinco são utilizadas para ampliar a disponibilidade deste micronutriente (MUMTAZ et al., 2017), uma vez que o mesmo apresenta baixa mobilidade e se encontra em formas insolúveis no solo o que impede seu aproveitamento pela vegetação e microrganismos. A síntese de substâncias quelantes de íons de zinco é uma das principais estratégias microbianas para o suprimento de sua demanda nutricional por este elemento que pode indiretamente contribuir para a biodisponibilização deste para as plantas. Entretanto, como as bactérias utilizam o micronutriente para manutenção do seu metabolismo celular é possível que este mecanismo nem sempre resulte na disponibilização do elemento. A imobilização do zinco pelo *Bacillus subtilis* pode ter contribuído para reduzir a disponibilidade do mesmo e, assim, não potencializar o crescimento do milho mediante a combinação

destes fatores indicando, neste caso, que a aplicação simultânea da rizobactéria e do micronutriente produziu resposta antagônica para as plantas. Portanto, é possível que tenha havido competição entre milho e microrganismo pelo zinco aplicado nas sementes uma vez que observou-se efeito para os incrementos tanto na massa do colmo quanto na total (Tabela 2) somente quando o *Bacillus subtilis* não foi combinado ao mesmo.

As respostas derivadas do uso de *Bacillus* como agente potencializador da biodisponibilização para as plantas de fontes insolúveis de zinco, como o ZnO, divergiram das verificadas por Hussain et al. (2015) que ao utilizarem este gênero bacteriano confirmaram sua ação solubilizadora para este nutriente e, adicionalmente, incrementos nas variáveis relacionadas ao crescimento inicial do milho (comprimentos e massas da parte aérea e radicular). Por outro lado, no presente experimento, ficou evidenciada a importância do zinco para o crescimento das plantas, tendo em vista que nas interações em que o micronutriente esteve envolvido as massas da folha, do colmo e total foram aumentadas. Resultados similares considerando o uso do elemento (zinco), da fonte (ZnO) e forma de aplicação (nas sementes) foram verificados por Prado et al. (2007).

Tabela 3 - Massas da parte aérea e total da planta seca (MPAS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante em função da interação entre zinco e nitrogênio^(1, 2)

Variáveis	Nitrogênio	Zinco		CV (%)
		Ausência	Presença	
MPAS (g)	Ausência	69,57 Ab	73,71 Aa	11,07
	Presença	75,19 Aa	71,90 Aa	
MTPS (g)	Ausência	80,36 Bb	86,19 Aa	10,90
	Presença	87,05 Aa	83,58 Aa	
NAPA (mg)	Ausência	1135,91 Ab	1236,61 Aa	2,08
	Presença	1279,46 Aa	1163,79 Ba	

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES A, D, I e J.

Na interação dupla envolvendo o efeito da combinação entre os fertilizantes químicos no crescimento das plantas, verificou-se incrementos para a massa total do milho quando o zinco foi aplicado nas sementes ou adubo nitrogenado adicionado ao solo e, neste caso, os elementos interferiram de forma similar para o aumento desta variável. Porém, somente na ausência de zinco foi observada resposta do nitrogênio

em aumentar a massa da parte aérea e seu acúmulo na mesma. Observando-se os resultados das três variáveis verifica-se que, de modo geral, quando não se detectaram aumentos devidos a nitrogênio ou zinco os efeitos de ambos foram compensatórios de forma que a presença de um equilibrou a ausência de aplicação do outro (Tabela 3).

Os efeitos produzidos no diâmetro do colmo do milho foram derivados da aplicação combinada de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e fertilizante nitrogenado. Resultados desta interação também foram observados para o nitrogênio acumulado na parte aérea. Respostas positivas provenientes das rizobactérias foram percebidas nas plantas mediante inoculação combinada destas nas sementes considerando a ausência de adubação nitrogenada no solo. Em função dos microrganismos verificou-se incrementos de 9,0% a 13,8% no diâmetro do colmo e de 13,1% a 27,4% na quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea. Portanto, os acréscimos observados evidenciam que houve sinergismo entre ambas as espécies de bactérias em promover o aumento destas variáveis (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Diâmetro basal do colmo (mm) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio^(1, 2)

Rizobactérias		Nitrogênio		CV (%)
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Ausência	Presença	
Ausência	Ausência	18,18 Aa <u>A</u>	17,67 Aa <u>A</u>	8,19
Ausência	Presença	16,78 Ab <u>b</u>	17,72 Aa <u>a</u>	
Presença	Ausência	17,22 Ab <u>A</u>	18,10 Aa <u>A</u>	
Presença	Presença	19,09 Aa <u>a</u>	17,51 Bb <u>a</u>	

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna, maiúscula sublinhada na coluna para primeira e terceira média e minúscula sublinhada na coluna para segunda e quarta média não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES A, C e E.

Incremento no diâmetro do colmo tal como o observado no presente experimento (Tabela 4) foi obtido em outros trabalhos, porém, não devido ao efeito de *Azospirillum brasilense* e/ou *Bacillus subtilis*, mas sim da aplicação de altas doses de nitrogênio em cobertura. Kappes et al. (2017) utilizando dose de 120 kg.ha⁻¹ no estádio V5 obtiveram colmos com diâmetro 6,7% maior em comparação aos verificados na ausência de adubação nitrogenada. Já Carmo et al. (2012) verificaram que o uso de 150 kg.ha⁻¹ no estádio V4 proporcionou tendência de aumento desta variável em até 11,9%. Considerando que o colmo do milho é uma estrutura tanto de suporte das folhas e partes florais quanto de armazenamento de nutrientes, as rizobactérias contribuíram também para ampliar os benefícios às plantas nestes aspectos.

Tabela 5 - Nitrogênio acumulado na parte aérea (mg) do milho AL Bandeirante em função da interação entre *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio^(1, 2)

Rizobactérias		Nitrogênio		CV (%)
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Ausência	Presença	
Ausência	Ausência	1157,29 Aa <u>A</u>	1183,06 Aa <u>A</u>	2,08
Ausência	Presença	1055,45 Bab <u>b</u>	1215,22 Aaa <u>a</u>	
Presença	Ausência	1188,05 Ab <u>A</u>	1289,21 Aa <u>A</u>	
Presença	Presença	1344,24 Aaa <u>a</u>	1199,02 Aaa <u>a</u>	

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna, maiúscula sublinhada na coluna para primeira e terceira média e minúscula sublinhada na coluna para segunda e quarta média não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES A, D e K.

Como *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* foram inoculadas por ocasião da semeadura e nenhuma fonte adicional de nitrogênio foi utilizada, pode-se considerar que o aumento da quantidade acumulada deste elemento na parte aérea das plantas deveu-se apenas à contribuição das rizobactérias. Além disso, o maior acúmulo de nitrogênio nas plantas obtido mediante a inoculação de ambas as espécies microbianas evidencia que seu efeito conjunto foi maior que o individual em ampliar a disponibilização do nitrogênio biologicamente fixado. O aumento médio deste elemento na parte aérea foi de 20,3% na presença de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*. Por outro lado, quando apenas um ou outro microrganismo foi inoculado e a adubação nitrogenada não foi efetuada diferenças no acúmulo do nutriente não foram observadas (Tabela 5). O efeito sinérgico das rizobactérias para o diâmetro do colmo também foi verificado somente na ausência de adubação nitrogenada (Tabela 4). Neste caso evidencia-se que a inoculação de ambos os microrganismos é mais vantajosa quando fontes adicionais de nitrogênio não são aplicadas ao solo.

O incremento na quantidade de nitrogênio acumulada no milho derivado da inoculação de *Bacillus subtilis* combinada à adubação nitrogenada na ausência de *Azospirillum brasilense* indica que esta rizobactéria também foi eficiente em melhorar o aproveitamento pelas plantas do nutriente adicionado ao solo (Tabela 5). É possível que devido ao potencial de colonização radicular apresentado por esta espécie microbiana, a síntese e a concentração na rizosfera de substâncias provenientes de seu metabolismo contribuiu para otimizar a absorção e aproveitamento do fertilizante nitrogenado aplicado ao solo. Lima et al. (2011) também verificaram que o acúmulo de nitrogênio na planta foi maior quando *Bacillus subtilis* foi combinado às doses de

120 e 160 kg.ha⁻¹ deste elemento. Porém, o aumento relativo obtido pelos autores para esta variável na menor (11%) e maior (13%) dosagem foi inferior ao observado (15%) neste experimento efetuando-se a adubação na dose de apenas 30 kg.ha⁻¹ de nitrogênio por ocasião da semeadura do milho.

Não foi verificado efeito isolado e/ou combinado dos fatores avaliados neste trabalho para a altura e massa radicular do milho (APÊNDICES C e D). Portanto, no caso destas variáveis, nem as rizobactérias (*Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*) tampouco os fertilizantes químicos (óxido de zinco e ureia) interferiram de forma suficiente para promover diferenças que fossem consideradas significativas.

4.2 EXPERIMENTO 2

A fertilização nitrogenada 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 6. Respostas positivas ou negativas para estas mesmas variáveis não foram verificadas quando a inoculação de *Azospirillum brasilense* foi efetuada nas sementes e/ou folhas (APÊNDICES L e M). Efeito similar para as massas (colmo, parte aérea e total) derivado da adubação também foi verificado por Picazevicz (2017) mediante utilização da mesma fonte (ureia) e dose de nitrogênio (30 kg.ha⁻¹) consideradas no presente experimento.

Tabela 6 - 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^(1, 2)

Nitrogênio	MCS	MPAS	MTPS	NAPA
 g			mg
Ausência ³	40,09 b	78,60 b	90,64 b	1367,07 b
Presença ⁴	44,55 a	89,06 a	100,88 a	1545,24 a
CV (%)	17,22	16,55	16,72	19,23

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;

2 - Testes estatísticos nos APÊNDICES B, L e M;

3 - N(0)AbS(0)AbF(0), N(0)AbS(1)AbF(0), N(0)AbS(0)AbF(1), N(0)AbS(1)AbF(1);

4 - N(1)AbS(0)AbF(0), N(1)AbS(1)AbF(0), N(1)AbS(0)AbF(1), N(1)AbS(1)AbF(1).

Entre os nutrientes, o nitrogênio é o que normalmente proporciona maiores incrementos no crescimento e produção das plantas (OKUMURA et al., 2011). Assim como verificado por Andrade et al. (2014), Biesdorf et al. (2016), Morais et al. (2015) e Dantas et al. (2014), os resultados obtidos neste experimento evidenciam a importância deste macronutriente para a cultura sendo essencial que o mesmo seja disponibilizado já nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas. 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.

Embora a expectativa com a realização deste experimento fosse a de que *Azospirillum brasilense* ao ser inoculada nas sementes e/ou nas folhas intensificasse o crescimento das plantas os resultados obtidos não evidenciaram a produção de efeitos significativos proporcionados pela rizobactéria ou em função do método de aplicação desta. Kappes et al. (2017) e Santini et al. (2018) também não verificaram respostas para crescimento do milho ou quanto ao acúmulo de nitrogênio no mesmo em função do uso ou forma de inoculação (sementes e/ou folhas) do microrganismo.

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, considerando apenas as variáveis mais importantes e representativas, que esta espécie de rizobactéria apresenta tendência em ampliar a massa total do milho e o acúmulo de nitrogênio no mesmo quando não se efetua a adubação nitrogenada (Tabelas 7 e 8), tem desempenho similar ao uso apenas de nitrogênio sem inoculação (Tabelas 9 e 10) e não é capaz de potencializar o efeito derivado da aplicação do fertilizante nitrogenado (Tabelas 11 e 12).

Tabela 7 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), independente de 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^(1, 2)

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
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/ou folhas	93,77 a	1427,30 a
CV (%)	16,72	19,23

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE N.

Tabela 8 - 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^(1, 2)

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

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE O.

Embora na ausência de adubação nitrogenada não tenham sido detectados para massa total e nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas incrementos considerados significativos devidos à inoculação de *Azospirillum brasilense* e sim, apenas tendência de aumentos para estas variáveis (Tabela 7), é importante destacar que evidenciou-se sua ação diazotrófica tendo em vista a obtenção de maior quantidade de nitrogênio acumulada nas plantas quando a bactéria foi inoculada nas sementes (Tabela 8). Em função deste procedimento de aplicação, verificou-se que o microrganismo contribuiu para aumentar a quantidade deste macronutriente nas plantas em relação ao solo sem adubação nitrogenada. 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 apenas com a 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 (Tabelas 9 e 10). 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.

Tabela 9 - 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^(1, 2)

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

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE P.

Tabela 10 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), considerando sua forma de aplicação, com ou sem adubação nitrogenada (AN) do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante^(1, 2)

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
Sem AN e com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas sementes	94,60 a	1557,35 a
Com AN e sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
Sem AN e com inoculação de <i>Ab</i> apenas nas folhas	90,72 a	1435,28 a
Com AN e sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
Sem AN e com inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e folhas	96,01 a	1289,27 a
Com AN e sem inoculação de <i>Ab</i> nas sementes e/ou folhas	94,71 a	1583,80 a
CV (%)	16,72	19,23

Notas: 1 - Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE Q.

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 (Tabelas 11 e 12). Portanto, neste caso, o uso simultâneo de fontes biológicas e químicas não produziu resultados superiores aos obtidos individualmente.

Tabela 11 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense* (*Ab*), independente de 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^(1, 2)

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	mg
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/ou folhas	102,94 a	1532,41 a
CV (%)	16,72	19,23

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE R.

Tabela 12 - 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^(1, 2)

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

Notas: 1 - Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE S.

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 quanto a forma de aplicação da rizobactéria uma vez que a inoculação destas nas sementes ou nas folhas resultou em respostas similares quanto a massa total do milho e acúmulo de nitrogênio nas plantas (Tabela 13). Porém, considerando o custo operacional de aplicação do produto biológico é recomendável que este seja aplicado nas sementes e não nas folhas.

Tabela 13 - Comparação por contrastes ortogonais entre a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes ou folhas, independente da adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante^(1, 2)

Tratamentos	MTPS	NAPA
	g	Mg
Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> nas sementes	99,76 a	1554,22 a
Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> nas folhas	97,57 a	1484,25 a
CV (%)	16,72	19,23

Notas: 1 - Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste F;
2 - Análise de variância no APÊNDICE T.

Os resultados deste experimento indicam que a inoculação de *Azospirillum brasilense* pode tanto se constituir como alternativa à adubação nitrogenada quando esta não é efetuada quanto produzir respostas de crescimento nas plantas similares às observadas mediante a adição de nitrogênio no solo. 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. Desta forma, fica evidenciada que a atividade de *Azospirillum brasilense* não se restringe apenas à nutrição nitrogenada do milho.

5 CONCLUSÕES

A adubação nitrogenada do solo, na ausência de aplicação de zinco nas sementes, incrementa a massa da parte aérea e o nitrogênio acumulado nas plantas do milho AL Bandeirante.

A massa total do milho AL Bandeirante aumenta quando as aplicações de nitrogênio e zinco não são combinadas.

O zinco incrementa as massas total e do colmo do milho AL Bandeirante quando não é combinado ao *Bacillus subtilis*.

Azospirillum brasilense e zinco combinados aumentam a massa foliar do milho AL Bandeirante.

Azospirillum brasilense e *Bacillus subtilis*, na ausência de adubação nitrogenada, aumentam o diâmetro do colmo e o acúmulo de nitrogênio no milho AL Bandeirante.

Bacillus subtilis na ausência de *Azospirillum brasilense* potencializa o efeito da adubação nitrogenada em incrementar o nitrogênio acumulado no milho AL Bandeirante.

A adubação nitrogenada de 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 e/ou folhas produz efeito similar ao que se verifica apenas com a adubação nitrogenada do solo para a massa total e quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea do milho AL Bandeirante.

O efeito da adubação nitrogenada não é potencializado pela inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas.

Azospirillum brasilense ao ser inoculado nas sementes ou nas folhas interfere de forma similar na massa total do milho AL Bandeirante e na quantidade de nitrogênio acumulada em sua parte aérea.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados e conclusões de ambos os experimentos indicam que tanto a aplicação de zinco nas sementes quanto a inoculação destas com *Azospirillum brasilense* e/ou *Bacillus subtilis* ou não interferiu ou contribuiu, de forma isolada ou combinada, inclusive com o fertilizante nitrogenado, para aumentar o crescimento do milho e a quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea do mesmo. Portanto, considerando esta situação e o fato dos produtos químicos e biológicos utilizados não terem causado qualquer prejuízo a variedade considerada como referencial do trabalho (AL Bandeirante) é recomendável o uso dos mesmos como estratégia para obter, com baixo custo econômico e operacional, plantas vigorosas e, em consequência, potencialmente mais produtivas. Além disso, como há inúmeras variedades e cultivares de milho e, também, solos muito distintos física, química e biologicamente, em condições diferentes das consideradas nos presentes trabalhos há possibilidade de se obter contribuições mais significativas e relevantes derivadas das práticas utilizadas. É importante ainda destacar que qualquer benefício proveniente do uso de micronutrientes e/ou rizobactérias nas sementes, por mínimo que possa ser, já deve ser considerado desejável uma vez que são produtos químicos e biológicos normalmente de fácil, rápida e econômica aplicação que podem, isoladamente ou combinados, até mesmo se equiparar em contribuição para o crescimento e produção das plantas ao que se obtém com altas doses de fertilizantes químicos como os nitrogenados, porém sem possibilidade de perdas ou de impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 26, n. 1, p. 1-20, Jan. 2014.
- ALLOWAY, B. J. **Zinc in soils and crop nutrition**. 2. ed. Brussels; Paris: IZA; IFA, 2008. 135 p.
- ANDRADE, F. R.; PETTER, F. A.; NÓBREGA, J. C. A.; PACHECO, L. P.; ZUFFO, A. M. Desempenho agrônômico do milho a doses e épocas de aplicação de nitrogênio no Cerrado piauiense. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, PA, v. 57, n. 4, p. 358-366, out./dez. 2014.
- ARAÚJO, E. O.; MERCANTE, F. M.; VITORIMO, A. C. T. Effect of nitrogen fertilization associated with inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on corn. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 137-145, Jan. 2015.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, n. 8/9, p. 1639-1645, Dec. 2005.
- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, set. 1999.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 456-462, mar./abr. 2008.
- ARKHIPOVA, T. N.; VESELOV, S. U.; MELENTIEV, A. I.; MARTYNENKO, E. V.; KUDOYAROVA, G. R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 272, n. 1/2, p. 201-209, May 2005.
- ATIENO, M.; HERRMANN, L.; OKALEBO, R.; LESUEUR, D. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 7, p. 2541-2550, July 2012.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, May/June 1997.
- BARNETTE, R. M.; CAMP, J. P.; WAGNER, J. D.; GALL, O. E. **The use of zinc sulfate under corn and other field crops**. Florida: Agricultural Experiment Stations. 1936. 292 p.
- BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A cultura do milho**. Évora: Ed. da Universidade de Évora, 2014. 52 p.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160A, n. 901, p. 268-282, May 1937.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. de. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: a critical assessment. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 108, n. 1, p. 77-136, Sept. 2010.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, Apr. 2012.

BIESDORF, E. M.; BIESDORF, E. M.; TEIXEIRA, M. F. F.; DIETRICH, O. H.; PIMENTEL, L. D.; ARAUJO, C. de. Métodos de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em solo de cerrado. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 3, n. 1, p. 44-50, jan./mar. 2016.

BORRIS, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.). **Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. p. 41-76.

BROWN, P. H.; CAKMAK, I.; ZHANG, Q. **Form and function of zinc in plants**. Dordrecht: Kluwar Academic Publishers, 1993. 93 p.

BÜLL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. (ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1993. p. 63-145.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 91-110, Apr./June 2000.

CABRA CENDALES, T.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, C. A.; VILLOTA CUÁSQUER, C. P.; TAPASCO ALZATE, O. A.; HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, A. *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). **Acta Biológica Colombiana**, Bogotá, v. 22, n. 1, p. 37-44, enero/abr. 2017.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa, MG: Ed. da Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 139-182.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-469.

CARMO, M. S. do; CRUZ, S. C. S.; SOUZA, E. J. de; CAMPOS, L. F. C.; MACHADO, C. G. Doses e fontes de nitrogênio no desenvolvimento e produtividade da cultura de milho doce (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 223-231, mar. 2012. (suplemento 1).

CARVALHO, N. L. de; ZABOT, V. Nitrogênio: nutriente ou poluente? **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, RS, v. 6, n. 6, p. 960-974, mar. 2012.

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. (ed.). **Handbook for *Azospirillum***: technical issues and protocols. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 115-138.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants: with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 5, p. 493-513, Sept. 2009.

COELHO, A. M. **Nutrição e adubação do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 10 p. (Circular técnica, 78).

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária: safra 2017/2018**. v. 5. Brasília, DF: Conab, 2017. 111 p.

CONSOLINI, F.; COUTINHO, E. L. M. Efeito da aplicação de Zn e do pH do solo na disponibilidade do micronutriente. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 7-12, jan./mar. 2004.

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Ed. of Columbia University, 1981. 1262 p.

DANTAS, D. F. da S.; OLIVEIRA, A. P. de; BANDEIRA, N. V. da S.; PINHEIRO, S. M. G.; DANTAS, T. A. G.; SILVA, O. P. R. da. Produtividade de espigas e grãos verde de milho adubado com fontes e doses de nitrogênio. **Revista Agropecuária Técnica**, Areia, v. 35, n. 1, p. 100-105, jan./dez. 2014.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023-1029, out. 2013.

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**, Campina Grande, v. 20, n. 7, p. 606-611, jul. 2016.

DAVIES, B. E. Deficiencies and toxicities of trace elements and micronutrients in tropical soils: limitations of knowledge and future research needs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 16, n. 1, p. 75-83, Jan. 1997.

DIAS, M. A. N.; CICERO, S. M. Effect of copper carbonate and zinc oxide applied to seeds on copper and zinc uptake by maize seedlings. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 3, p. 286-291, jul./set. 2016.

DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, O. A.; BERGER, A.; SATORRE, E. H. Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (ed.). **Handbook for *Azospirillum***: technical issues and protocols. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 435-445.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, Mar./Apr. 2003.

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**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1-11, jul./dez. 2013.

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M. F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* BV. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. CV. 'Elkoka-05'). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n. 14, p. 2104-2119, Oct. 2010.

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L.; TRIVELIN, P. C. O. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho e utilização do N residual pela sucessão aveia preta - milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 38, n. 4, p. 1138-1141, jul. 2008.

FERREIRA, M. M. M. Sintomas de deficiência de macro e micronutrientes de plantas de milho híbrido BRS 1010. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa Vista, RR, v. 6, n. 1, p. 74-83, jan./abr. 2012.

FIGUEIREDO, M. do V. B.; ARAÚJO, A. S. F. de; BURITY, H. A.; LIRA JUNIOR, M. de A. Biodiversity and the potencial of PGPR: plant-microorganism interactions. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. (ed.). **Microbial ecology of tropical soils**. New York: Nova Science Publishers, 2011. p. 109-137.

FIGUEIREDO, M. do V. B.; LIRA JUNIOR, M. de A.; MESSIAS, A. S.; MENEZES, R. S. C. Potential impact of biological nitrogen fixation and organic fertilization on corn growth and yield in low external input systems. In: DANFORTH, A. T. (ed.) **Corn crop production: growth, fertilization and yield**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 227-255.

GALRÃO, E. Z. Métodos de aplicação de zinco e avaliação de sua disponibilidade para o milho num Latossolo Vermelho-Escuro, argiloso, fase Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 283-289, maio/ago. 1996.

GALRÃO, E. Z. Métodos de correção da deficiência de zinco para o cultivo do milho num Latossolo Vermelho-Escuro, argiloso, sob Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 229-233, maio/ago. 1994.

GALRÃO, E. Z. Micronutrientes. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p. 185-226.

GALRÃO, E. Z. Níveis críticos de zinco para o milho cultivado em latossolo vermelho-amarelo, fase Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 255-260, maio/ago. 1995.

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**, Lisboa, v. 40, n. 2, p. 353-362, maio 2017.

GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; TRAUTMANN, R. R.; MARENGONI, N. G.; RIBEIRO, O. L.; SANTOS, A. L. dos. Produtividade do milho em resposta a adubação com NPK e Zn em Argissolo Vermelho-Amarelo Eutrófico e Latossolo Vermelho Eutroférico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1231-1236, jul./ago. 2007.

GOTETI, P. K.; EMMANUEL, L. D. A.; DESAI, S.; SHAIK, M. H. A. Prospective zinc solubilizing bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). **International Journal of Microbiology**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-7, Jan./Dec. 2013.

GOTT, R. M.; SICHOCKI, D.; AQUINO, L. A.; XAVIER, F. O.; SANTOS, L. P. D. dos; AQUINO, R. F. B. A. de. Fontes e épocas de aplicação de nitrogênio no milho safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.13, n.1, p. 24-34, jan./abr. 2014.

GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H-S; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, Jena, v. 206, n. 1, p. 131-140, Jan. 2018.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F. A. A.; CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. de C. e. **Micorganismos estimulantes na agricultura**. Piracicaba: Ed. da ESALQ, 2015. 56 p.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, Princeton, v. 11, n. 1, p. 1-21, Feb. 1969.

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**, Hague, v. 331, n. 1, p. 413-425, June 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Documentos, 325).

HUSSAIN, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A.; ASGHAR, M. Prospects of zinc solubilizing bacteria for enhancing growth of maize. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 52, n. 4, p. 915-922, Dec. 2015.

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; SILVA, M. B. da; DIAMANTE, M. S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T. M.; DUARTE JÚNIOR, J. B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 9, n. 48, p. 3480-3487, Nov. 2014.

JAMAMI, N.; BÜL, L. T.; CORRÊA, J. C.; RODRIGUES, J. D. Resposta da cultura do milho (*Zea mays* L.) à aplicação de boro e de zinco no solo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 99-105, jan./mar. 2006.

JONES, L.; PROVINS, A.; HOLLAND, M.; MILLS, G.; HAYES, F.; EMMETT, B.; HALL, J.; SHEPPARD, L.; SMITH, R.; SUTTON, M.; HICKS, K.; ASHMORE, M.; HAINES-YOUNG, R.; HARPER-SIMMONDS, L. A review and application of the evidence for nitrogen impacts on ecosystem services. **Ecosystem Services**, Wageningen, v. 7, n. 1, p. 76-88, Mar. 2014.

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**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, mar./abr. 2013.

KAPPES, C.; SILVA, R. G. da; FERREIRA, V. E. N. Aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura no milho safrinha. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 3, p. 366-373, jul./set. 2017.

KARLEN, D. L.; FLANNERY, R. L.; SADLER, E. J. Aerial accumulation and partitioning of nutrients by corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 80, n. 2, p. 232-242, June 1988.

KARLEN, D. L.; FLANNERY, R. L.; SADLER, E. J. Nutrient and dry matter accumulation rates for high yielding maize. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 9, p. 1409-1417, Sept./Nov.1987.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLOS ONE**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 1-19, Mar. 2016.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.). **Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems**, Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. p. 37-59.

LANA, M. do C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 59, n. 3, p. 399-405, maio/jun. 2012.

LEAL, R. M.; FRANCO, C. F.; BRAGHIROLI, L. F.; ARTUR, A. G.; SABONARO, D. Z.; BETTINI, M.; PRADO, R. de M. Efeito da aplicação de zinco em sementes sobre a nutrição e a produção de massa seca de plantas de milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 491-496, out./dez. 2007.

LEGHARI, S. H.; WAHOCHO, N. A.; LAGHARI, G. M.; LAGHARI, A. B.; BHABHAN, G. M.; TALPUR, K. H.; BUTTHO, T. A.; WAHOCHO, S. A.; LASHARI, A. A. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 10, n. 9, p. 209-218, Sept. 2016.

LIMA, F. F.; NUNES, L. A. P. L.; FIGUEIREDO, M. do V. B.; ARAÚJO, F. F. de; LIMA, L. M.; ARAÚJO, A. S. F. de. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 4, p. 544-550, jul./set. 2011.

LYNGWI, N. A.; JOSHI, S. R. Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. In: SEN, A. (ed.). **Biology of useful plants and microbes**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2014. p. 33-43.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 10 p. (Circular técnica, 76).

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; GOMIDE, R. L. Fisiologia da cultura do milho. *In*: BENASSI, A. C.; FULLIN, E. A.; SILVA, J. G. F.; ZANGRANDE, M. B.; FERRAO, R. G.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A.; DURAES, F. O. M.; SILVA, J. G.; GOMIDE, R. L.; MAGALHÃES, P. C.; RESENDE, C. I. **Manual técnico para a cultura do milho no Estado do Espírito Santo**. Vitória: EMCAPA, 1996. p. 15-34. (Documentos, 77).

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Zoneamento agrícola de risco climático para a cultura do milho no Estado do Acre, ano safra 2015/2016. Portaria n. 143. **Diário Oficial da União**, 4 de agosto de 2015. Brasília, DF, 2015.

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**, Viçosa, MG, v. 62, n.1, p. 117-123, jan./fev. 2015.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, Münster, v. 5, n. 1, p. 71-81, Nov. 2015.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 10, n. 3, p. 293-319, July 2010.

MAZZUCHELLI, R. de C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAÚJO, F. F. de. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 10, n. 2, p. 40-47, jul./dez. 2014.

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H. de; FERREIRA, A. de 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**, Viçosa, MG, v. 62, n. 6, p. 589-596, nov./dez. 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. da Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.

MOUSAVI, S. R. Zinc in crop production and interaction with phosphorus. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Amman, v. 5, n. 9, p. 1503-1509, Sept. 2011.

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**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 97-103, abr./jun. 2017.

MUMTAZ, M. Z.; AHMAD, M.; JAMIL, M.; HUSSAIN, T. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. **Microbiological Research**, Jena, v. 202, n. 1, p. 51-60, Sept. 2017.

NOGUEIRA, M. C. S. Orthogonal contrasts: definitions and concepts. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 1, p. 118-124, jan./fev. 2004.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. de; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, p. 1687-1698, 2011. (suplemento 1).

OKUMURA, R. S.; TAKAHASHI, H. W.; SANTOS, D. G. C. dos; LOBATO, A. K. da S.; MARIANO, D. de C.; MARQUES, O. J.; SILVA, M. H. L. da; OLIVEIRA NETO, C. F. de; LIMA JUNIOR, J. A. de. Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 9, n. 3/4, p. 510-514, July/Oct. 2011.

PANDOLFO, C. A.; VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 27, n. 3, p. 94-99, nov. 2014.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Ed. da Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 429-485.

PEREIRA, L. de M.; PEREIRA, E. de 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 Agrônômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 630-637, jul./set. 2015.

PEREIRA, N. M. Z.; ERNANI, P. R.; SANGOI, L. Disponibilidade de zinco para o milho afetada pela adição de Zn e pelo pH do solo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 3, p. 273-284, set./dez. 2007.

PICAZEVICZ, A. A. C. **Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molibdênio e nitrogênio**. Orientador: Jorge Ferreira Kusdra. 2017. 79 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2017.

PICAZEVICZ, A. A. C.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. de L. Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 21, n. 9, p. 623-627, out. 2017.

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**, Helsinki, v. 13, n. 3/4, p. 67-73, July/Oct. 2015.

PISHCHIK, V. N.; VOROBYON, N.; MOISEEV, K. G.; SVIRIDOVA, O. V.; SURIN, V. G. Influence of *Bacillus subtilis* on the physiological state of wheat and the microbial community of the soil under different rates of nitrogen fertilizers. **Eurasian Soil Science**, Moscou, v. 48, n. 1, p. 77-44, Jan. 2015.

PRADO, R. de M.; NATALE, W.; MOURO, M. de C. Fontes de zinco aplicado via semente na nutrição e crescimento inicial do milho cv. Fort. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 16-24, abr./jun. 2007.

PRADO, R. de M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: Ed. da Universidade Estadual de São Paulo, 2008. 407 p.

PRADO, R. M.; ROMUALDO, L. M.; ROZANE, D. E.; VIDAL, A. de A.; MARCELO, A. V. Modos de aplicação de zinco na nutrição e na produção de matéria seca do milho BRS 1001. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 67-74, jan./mar. 2008.

PREETHA, P. S.; STALIN, P. Response of maize to soil applied zinc fertilizer under varying available zinc status of soil. **Indian Journal of Science and Technology**, Chennai, v. 7, n. 7, p. 939-944, July 2014.

PUGA, A. P.; PRADO, R. de M.; FONSECA, I. M.; VALE, D. W. do; AVALHÃES, C. C. Ways of applying zinc to maize plants growing in Oxisol: effects on the soil, on plant nutrition and on yield. **IDESIA**, Arica, v. 31, n. 3, p. 29-37, Sept./Oct. 2013.

QUADROS, P. D. de; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F. da; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. de O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, n. 2, p. 209-218, mar./abr. 2014.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. de M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. *In*: FERNANDES, M. S. (ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J. da; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, set./dez. 2013.

RIBEIRO, N. D.; SANTOS, O. S. dos. Aproveitamento do zinco aplicado na semente na nutrição da planta. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 26, n. 1, p. 159-165, jan./abr. 1996.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como uma planta de milho se desenvolve. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 26, n. 103, p. 1-20, set. 2003.

ROSOLEM, C. A.; FERRARI, L. F. Crescimento inicial e absorção de zinco pelo milho em função do modo de aplicação e fontes do nutriente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 151-157, jan./mar.1998.

ROSOLEM, C. A.; FOLONI, J. S. S.; OLIVEIRA, R. H. Dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem e adubação nitrogenada, com palha na superfície. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 2, p. 301-309, fev. 2003.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 13, n. 4, p. 905-927, Oct./Dec. 2013.

SANGOI, L.; ERNANI, P. R.; LECH, V. A. L.; RAMPAZZO, C. Lixiviação de nitrogênio afetada pela forma de aplicação da ureia e manejo dos restos culturais de aveia em dois solos com texturas contrastantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 33, n. 1, p. 65-70, fev. 2003.

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**, Campina Grande, v. 22, n. 6, p. 373-377, jun. 2018.

SANTOS, C. E. de R. e S.; FREITAS, A. D. S. de; VIEIRA, I. M. de M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. (ed.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 17-41.

SCHIAVINATTI, A. F.; ANDREOTTI, M.; BENETT, C. G. S.; PARIZ, C. M.; LODO, B. N.; BUZETTI, S. Influência de fontes e modos de aplicação de nitrogênio nos componentes da produção e produtividade do milho irrigado no cerrado. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 925-930, out./dez. 2011.

SHAHAB, Q.; AFZAL, M.; HUSSAIN, B.; ABBAS, N.; HUSSAIN, S. W.; ZEHRA, Q.; HUSSAIN, A.; HUSSAIN, Z.; ALI, A.; ABBAS, Y. Effect of different methods of zinc application on maize (*Zea mays* L.). **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, Dhaka, v. 9, n. 3, p. 66-75, Mar. 2016.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Boston, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, Dec. 1965.

SILVA, T. R. B. da; GUZELLA, R. E.; FREITAS, L. B. de; MAIA, S. C. M. Efeito da aplicação de nitrogênio em cobertura e zinco via foliar no milho safrinha em semeadura direta. **Agrarian**, Dourados, v. 1, n. 2, p. 59-69, out./dez. 2008.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1948. 503 p.

SOUZA, R. de; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, n. 38, v. 4, p. 401-419, out./dez. 2015.

TARIQ, A.; ANJUM, S. A.; RANDHAWA, M. A.; ULLAH, E.; NAEEM, M.; QAMAR, R.; ASHRAF, U.; NADEEM, M. Influence of zinc nutrition on growth and yield behaviour of maize (*Zea mays* L.) hybrids. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, n. 5, p. 2646-2654, Mar. 2014.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BISSANI, A. C.; BOHLEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim técnico, 5).

THORNE, W. Zinc deficiency and its control. **Advances in Agronomy**, New York, v. 9, n. 1, p. 31-65, Jan. 1957.

TRAORÉ, L.; BABANA, H.; ANTOUN, H.; LAHBIB, M.; SACKO, O.; NAKATSU, C.; STOTT, D. Isolation of six phosphate dissolving rhizosphere bacteria (*Bacillus subtilis*) and their effects on the growth, phosphorus nutrition and yield of maize (*Zea mays* L.) in Mali. **Journal of Agricultural Science and Technology**, El Monte, v. 6, n. 2, p. 93-107, Mar./Apr. 2016.

VASCONCELOS, A. C. P. de; SIQUEIRA, T. P.; LANA, R. M. Q.; FARIA, M. V. de; NUNES, A. A.; LANA, A. M. Q. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and N fertilization of corn in the Cerrado biome. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 63, n. 5, p. 732-740, set./out. 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas, do colmo, da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MFS, MCS, MPAS, MRS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante avaliadas no experimento 1⁽¹⁾

Variáveis	Transformação	Shapiro-Wilk		Bartlett	
		W_c	H_0	χ^2	H_0
AP	-	0,979	NR	16,899	NR
DBC	-	0,980	NR	18,057	NR
MFS	-	0,984	NR	13,912	NR
MCS	-	0,978	NR	11,681	NR
MPAS	-	0,980	NR	15,391	NR
MRS	-	0,977	NR	22,537	NR
MTPS	-	0,984	NR	15,270	NR
NAPA	-	0,988	NR	30,059	R
NAPA	log x	0,969	NR	24,028	NR

Nota: 1 - NR - não rejeita-se a hipótese da nulidade; R - rejeita-se a hipótese da nulidade.

APÊNDICE B – Normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas, do colmo, da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MFS, MCS, MPAS, MRS e MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante avaliadas no experimento 2⁽¹⁾

Variáveis	Transformação	Shapiro-Wilk		Bartlett	
		W_c	H_0	χ^2	H_0
AP	-	0,940	NR	12,705	NR
DBC	-	0,979	NR	8,248	NR
MFS	-	0,987	NR	7,100	NR
MCS	-	0,980	NR	5,227	NR
MPAS	-	0,986	NR	9,832	NR
MRS	-	0,975	NR	9,210	NR
MTPS	-	0,989	NR	8,625	NR
NAPA	-	0,971	NR	5,265	NR

Nota: 1 - NR - não rejeita-se a hipótese da nulidade; R - rejeita-se a hipótese da nulidade.

APÊNDICE C – Análise de variância das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas e do colmo secos (MFS e MCS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1⁽¹⁾

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		AP	DBC	MFS	MCS
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	1	437,7604 ^{ns}	3,6309 ^{ns}	16,5336 ^{ns}	26,6810 ^{ns}
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)	1	27,0938 ^{ns}	0,0047 ^{ns}	3,5574 ^{ns}	21,7266 ^{ns}
Zinco (Zn)	1	128,3438 ^{ns}	0,0231 ^{ns}	25,0717 ^{ns}	0,1373 ^{ns}
Nitrogênio (N)	1	311,7604 ^{ns}	0,1073 ^{ns}	0,3361 ^{ns}	34,5240 ^{ns}
Ab x Bs	1	58,5938 ^{ns}	10,3425*	3,8001 ^{ns}	53,9850 ^{ns}
Ab x Zn	1	0,8438 ^{ns}	0,0982 ^{ns}	41,8176*	9,3563 ^{ns}
Ab x N	1	0,2604 ^{ns}	1,8900 ^{ns}	0,0570 ^{ns}	0,3071 ^{ns}
Bs x Zn	1	119,2604 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	7,9811 ^{ns}	134,1192**
Bs x N	1	595,0104 ^{ns}	1,5025 ^{ns}	1,2105 ^{ns}	70,6066 ^{ns}
Zn x N	1	3,7604 ^{ns}	0,0575 ^{ns}	19,1888 ^{ns}	6,4015 ^{ns}
Ab x Bs x Zn	1	123,7604 ^{ns}	4,5806 ^{ns}	0,0693 ^{ns}	3,1938 ^{ns}
Ab x Bs x N	1	356,5104 ^{ns}	22,8833**	14,8523 ^{ns}	36,4943 ^{ns}
Ab x Zn x N	1	1,2604 ^{ns}	0,0688 ^{ns}	29,2383 ^{ns}	23,1379 ^{ns}
Bs x Zn x N	1	119,2604 ^{ns}	0,0062 ^{ns}	11,3850 ^{ns}	15,2721 ^{ns}
Ab x Bs x Zn x N	1	123,7604 ^{ns}	1,4925 ^{ns}	3,6660 ^{ns}	22,3398 ^{ns}
Erro	80	239,2313	2,1199	8,6310	18,1432
Total	95	-	-	-	-
CV (%)		8,28	8,19	11,89	11,66

Nota: 1 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE D – Análise de variância das variáveis massa da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MPAS, MRS, MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		MPAS	MRS	MTPS	NAPA
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	1	43,8210 ^{ns}	6,4429 ^{ns}	16,6583 ^{ns}	0,0273*
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)	1	6,2017 ^{ns}	5,6989 ^{ns}	23,7905 ^{ns}	<0,0001 ^{ns}
Zinco (Zn)	1	4,2926 ^{ns}	13,9766 ^{ns}	33,7607 ^{ns}	0,0003 ^{ns}
Nitrogênio (N)	1	86,7160 ^{ns}	0,4415 ^{ns}	99,5319 ^{ns}	0,0057 ^{ns}
Ab x Bs	1	82,9560 ^{ns}	19,3771 ^{ns}	182,5189 ^{ns}	0,0024 ^{ns}
Ab x Zn	1	206,9175 ^{ns}	0,0163 ^{ns}	203,2635 ^{ns}	0,0155 ^{ns}
Ab x N	1	43,5243 ^{ns}	1,0901 ^{ns}	30,8380 ^{ns}	0,0088 ^{ns}
Bs x Zn	1	289,2593*	12,1339 ^{ns}	419,8812*	<0,0001 ^{ns}
Bs x N	1	199,1232 ^{ns}	7,4761 ^{ns}	129,4329 ^{ns}	0,0020 ^{ns}
Zn x N	1	331,9728*	20,8600 ^{ns}	519,2656*	0,0330**
Ab x Bs x Zn	1	5,0968 ^{ns}	0,2594 ^{ns}	7,6558 ^{ns}	0,0020 ^{ns}
Ab x Bs x N	1	231,1983 ^{ns}	2,9716 ^{ns}	286,5923 ^{ns}	0,0287**
Ab x Zn x N	1	1,6854 ^{ns}	20,1209 ^{ns}	33,4530 ^{ns}	0,0122 ^{ns}
Bs x Zn x N	1	33,8200 ^{ns}	7,6671 ^{ns}	9,2815 ^{ns}	0,0004 ^{ns}
Ab x Bs x Zn x N	1	5,8905 ^{ns}	9,9524 ^{ns}	31,1562 ^{ns}	0,0005 ^{ns}
Erro	80	64,6248	7,5175	84,3706	0,0041
Total	95	-	-	-	-
CV (%)		11,07	23,43	10,90	2,08

Notas: 1 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$);
 2 - Os dados da variável NAPA foram transformados para log x.

APÊNDICE E – Desdobramento da análise de variância da variável diâmetro basal do colmo do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação tripla dos fatores *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios
Ab dt [Bs(0) N(0)]	1	5,5681 ^{ns}
Ab dt [Bs(0) N(1)]	1	1,1008 ^{ns}
Ab dt [Bs(1) N(0)]	1	31,8090 ^{**}
Ab dt [Bs(1) N(1)]	1	0,2688 ^{ns}
Bs dt [Ab(0) N(0)]	1	11,7041 [*]
Bs dt [Ab(0) N(1)]	1	0,0187 ^{ns}
Bs dt [Ab(1) N(0)]	1	20,9627 ^{**}
Bs dt [Ab(1) N(1)]	1	2,0475 ^{ns}
N dt [Ab(0) Bs(0)]	1	1,5759 ^{ns}
N dt [Ab(0) Bs(1)]	1	5,3016 ^{ns}
N dt [Ab(1) Bs(0)]	1	4,6376 ^{ns}
N dt [Ab(1) Bs(1)]	1	14,8680 ^{**}
Erro	80	2,1199

Notas: 1 - Ab: *Azospirillum brasilense*; Bs: *Bacillus subtilis*; N: nitrogênio; dt: dentro;

2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;

3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE F – Desdobramento da análise de variância da variável massa das folhas secas do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores *Azospirillum brasilense* e zinco^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios
Ab dt [Zn(0)]	1	2,8812 ^{ns}
Ab dt [Zn(1)]	1	55,4700 [*]
Zn dt [Ab(0)]	1	1,0651 ^{ns}
Zn dt (Ab(1))	1	65,8243 ^{**}
Erro	80	8,6310

Notas: 1 - Ab: *Azospirillum brasilense*; Zn: zinco; dt: dentro;

2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;

3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE G – Desdobramento da análise de variância da variável massa do colmo seco do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores *Bacillus subtilis* e zinco^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios
Bs dt [Zn(0)]	1	23,9419 ^{ns}
Bs dt [Zn(1)]	1	131,9039 ^{**}
Zn dt [Bs(0)]	1	71,4188 ^{ns}
Zn dt (Bs(1))	1	62,8376 ^{ns}
Erro	80	18,1432

Notas: 1 - Bs: *Bacillus subtilis*; Zn: zinco; dt: dentro;
 2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;
 3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE H – Desdobramento da análise de variância das variáveis massa da parte aérea e total das plantas secas (MPAS e MTPS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores *Bacillus subtilis* e zinco^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MPAS	MTPS
Bs dt [Zn(0)]	1	105,3761 ^{ns}	121,8900 ^{ns}
Bs dt [Zn(1)]	1	190,0848 ^{ns}	321,7816 ^{ns}
Zn dt [Bs(0)]	1	182,0134 ^{ns}	345,8817 [*]
Zn dt (Bs(1))	1	111,5385 ^{ns}	107,7601 ^{ns}
Erro	80	64,6248	84,3706

Notas: 1 - Bs: *Bacillus subtilis*; Zn: zinco; dt: dentro;
 2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;
 3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE I – Desdobramento da análise de variância das variáveis massa da parte aérea e total das plantas secas (MPAS e MTPS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores zinco e nitrogênio^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MPAS	MTPS
Zn dt [N(0)]	1	205,8823 ^{ns}	408,9169 [*]
Zn dt [N(1)]	1	130,3832 ^{ns}	144,1094 ^{ns}
N dt [Zn(0)]	1	379,0128 [*]	536,7388 [*]
N dt (Zn(1))	1	39,6760 ^{ns}	82,0587 ^{ns}
Erro	80	64,6248	84,3706

Notas: 1 - Zn: zinco; N: nitrogênio; dt: dentro;
 2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;
 3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE J – Desdobramento da análise de variância da variável nitrogênio acumulado na parte aérea do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação dupla dos fatores zinco e nitrogênio^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios
Zn dt [N(0)]	1	0,0137 ^{ns}
Zn dt [N(1)]	1	0,0196*
N dt [Zn(0)]	1	0,0331**
N dt [Zn(1)]	1	0,0056 ^{ns}
Erro	80	0,0041

Notas: 1 - Zn: zinco; N: nitrogênio; dt: dentro;

2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;

3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE K – Desdobramento da análise de variância da variável nitrogênio acumulado na parte aérea do milho AL Bandeirante, avaliada no experimento 1, considerando a interação tripla dos fatores *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e nitrogênio^(1, 2, 3)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios
Ab dt [Bs(0) N(0)]	1	0,0004 ^{ns}
Ab dt [Bs(0) N(1)]	1	0,0092 ^{ns}
Ab dt [Bs(1) N(0)]	1	0,0570**
Ab dt [Bs(1) N(1)]	1	0,0006 ^{ns}
Bs dt [Ab(0) N(0)]	1	0,0077 ^{ns}
Bs dt [Ab(0) N(1)]	1	0,0014 ^{ns}
Bs dt [Ab(1) N(0)]	1	0,0171*
Bs dt [Ab(1) N(1)]	1	0,0070 ^{ns}
N dt [Ab(0) Bs(0)]	1	0,0005 ^{ns}
N dt [Ab(0) Bs(1)]	1	0,0216*
N dt [Ab(1) Bs(0)]	1	0,0096 ^{ns}
N dt [Ab(1) Bs(1)]	1	0,0135 ^{ns}
Erro	80	0,0041

Notas: 1 - Ab: *Azospirillum brasilense*; Bs: *Bacillus subtilis*; N: nitrogênio; dt: dentro;

2 - 0: ausência do fator; 1: presença do fator;

3 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE L – Análise de variância das variáveis altura da planta (AP), diâmetro basal do colmo (DBC), massa das folhas e do colmo secos (MFS e MCS) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 2^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		AP	DBC	MFS	MCS
AbS	1	1452,0000 ^{ns}	0,8164 ^{ns}	40,8852 ^{ns}	69,9867 ^{ns}
AbF	1	720,7500 ^{ns}	2,1000 ^{ns}	5,5760 ^{ns}	68,8323 ^{ns}
N	1	420,0833 ^{ns}	0,8112 ^{ns}	51,7505 ^{ns}	238,6992*
AbS x AbF	1	0,3333 ^{ns}	20,4885 ^{ns}	62,4720 ^{ns}	58,3884 ^{ns}
AbS x N	1	385,3333 ^{ns}	4,1067 ^{ns}	30,4645 ^{ns}	11,1169 ^{ns}
AbF x N	1	0,7500 ^{ns}	1,1347 ^{ns}	0,5167 ^{ns}	11,3880 ^{ns}
AbS x AbF x N	1	<0,0001 ^{ns}	0,6302 ^{ns}	11,9002 ^{ns}	0,7400 ^{ns}
Erro	40	371,5167	5,0787	24,1108	53,1281
Total	47	-	-	-	-
CV (%)		9,90	11,69	17,26	17,22

Notas: 1 - AbS: *Azospirillum brasilense* aplicado nas sementes; AbF: *Azospirillum brasilense* aplicado nas folhas; N: nitrogênio;

2 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE M – Análise de variância das variáveis massa da parte aérea, das raízes e total das plantas secas (MPAS, MRS, MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante, avaliadas no experimento 2^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		MPAS	MRS	MTS	NAPA
AbS	1	178,4865 ^{ns}	0,0638 ^{ns}	171,8012 ^{ns}	8734,5052 ^{ns}
AbF	1	249,2497 ^{ns}	24,2963 ^{ns}	429,1846 ^{ns}	22177,6812 ^{ns}
N	1	1313,3576*	0,5786 ^{ns}	1258,8033*	381016,5494*
AbS x AbF	1	314,1633 ^{ns}	5,8172 ^{ns}	405,4800 ^{ns}	190981,0083 ^{ns}
AbS x N	1	68,7844 ^{ns}	6,3875 ^{ns}	33,2501 ^{ns}	3634,1641 ^{ns}
AbF x N	1	76,3056 ^{ns}	8,2254 ^{ns}	134,6365 ^{ns}	57960,2200 ^{ns}
AbS x AbF x N	1	0,7450 ^{ns}	27,9838 ^{ns}	37,8608 ^{ns}	210187,6821 ^{ns}
Erro	40	192,3896	8,8105	256,3296	78378,5768
Total	47	-	-	-	-
CV (%)		16,55	24,88	16,72	19,23

Notas: 1 - AbS: *Azospirillum brasilense* aplicado nas sementes; AbF: *Azospirillum brasilense* aplicado nas folhas; N: nitrogênio;

2 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$); ** significativo a 1% ($p \leq 0,01$).

APÊNDICE N – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, independente de 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⁽¹⁾

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste	1	708,0085 ^{ns}	261239,1950 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Nota: 1 - ^{ns} não significativo (p>0,05).

APÊNDICE O – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, considerando sua forma de aplicação, sem adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e o nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste 1	1	536,0033 ^{ns}	412900,7403*
Contraste 2	1	269,8957 ^{ns}	185890,9669 ^{ns}
Contraste 3	1	655,1974 ^{ns}	31772,4334 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Notas: 1 - Contraste 1: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas sementes versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas; Contraste 2: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas folhas versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas; Contraste 3: inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e folhas versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas;

2 - ^{ns} não significativo (p>0,05); * significativo a 5% (0,01<p≤0,05).

APÊNDICE P – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense*, 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⁽¹⁾

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste	1	3,9481 ^{ns}	110207,3001 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Nota: 1 - ^{ns} não significativo (p>0,05).

APÊNDICE Q – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação ou não de *Azospirillum brasilense*, considerando 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^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste 1	1	0,0385 ^{ns}	2098,2785 ^{ns}
Contraste 2	1	47,8801 ^{ns}	66167,1554 ^{ns}
Contraste 3	1	5,0570 ^{ns}	260234,9269 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Notas: 1 - Contraste 1: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas sementes sem adubação nitrogenada versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas com adubação nitrogenada; Contraste 2: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas folhas sem adubação nitrogenada versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas com adubação nitrogenada; Contraste 3: inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e folhas sem adubação nitrogenada versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas com adubação nitrogenada;

2 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$).

APÊNDICE R – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, independente de 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⁽¹⁾

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste	1	304,5101 ^{ns}	11883,1667 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Nota: 1 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$).

APÊNDICE S – Análise de variância dos contrastes ortogonais referentes à comparação entre a inoculação e não de *Azospirillum brasilense*, 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^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste 1	1	313,3452 ^{ns}	3207,8700 ^{ns}
Contraste 2	1	282,7552 ^{ns}	7672,9861 ^{ns}
Contraste 3	1	67,6875 ^{ns}	15076,1763 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Notas: 1 - Contraste 1: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas sementes versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas; Contraste 2: inoculação de *Azospirillum brasilense* apenas nas folhas versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas; Contraste 3: inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e folhas versus sem inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes e/ou folhas;

2 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($0,01 < p \leq 0,05$).

APÊNDICE T – Análise de variância do contraste ortogonal referente à comparação entre a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes ou nas folhas, independente da adubação nitrogenada do solo, sobre a massa total da planta seca (MTPS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) do milho AL Bandeirante^(1, 2)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		MTPS	NAPA
Contraste	1	28,9521 ^{ns}	29374,1057 ^{ns}
Erro	40	256,3296	78378,5768

Nota: 1 - ^{ns} não significativo ($p > 0,05$).