**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**

***Azospirillum brasiliense*: interferências na qualidade das sementes e no
desenvolvimento das plantas de milho doce**

Gabriela Possati Fargoni

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2019**

Gabriela Possati Fargoni
Engenheira Agrônoma

***Azospirillum brasiliense*: interferências na qualidade das sementes e no
desenvolvimento das plantas de milho doce**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora
Prof.^a. Dr.^a. **ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Fargoni, Gabriela Possati

Azospirillum brasiliense: interferências na qualidade das sementes e no desenvolvimento das plantas de milho doce / Gabriela Possati Fargoni. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

73 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Milho doce grupo Saccharata 2. Tratamento biológico da semente 3. Nitrogênio
I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida, proteção e oportunidades.

À minha família, em especial minha mãe Lucimara Aparecida Possati, a minha avó Zulmira Spinelli Possati e ao meu avô Pedro Possati (*in memoriam*) pelo incentivo, motivação e exemplo de força, persistência e honestidade.

A todos meus familiares e amigos pelo apoio e por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realização de mais um objetivo.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) por me receber novamente como aluna, desta vez no curso de mestrado.

À professora Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida no início do curso.

Às empresas Agristar do Brasil e ao colega Murilo Magalhães pela cessão das sementes utilizadas neste projeto, à Monsanto do Brasil (Novozymes) e ao colega Pedro Buso pela cessão do inoculante utilizado na pesquisa. Dentro da mesma empresa, aos amigos queridos Flavio Leal, Jorge Hasegawa, Raphael Carneiro, Paulo Felici, que participaram no início da minha trajetória, auxiliando na obtenção de insumos, ideias, incentivos e motivação.

Aos queridos colegas do laboratório de sementes da ESALQ/USP, especialmente à Helena M. C. P. Chamma e Bruno Cardillo pelo auxílio, ensinamentos e amizade. Aos funcionários Adilson, João, Davi, Erreinaldo, Bisteca, Ticão pelo auxílio nos experimentos, compartilhamento de ideias, incentivo e contribuições valiosas ao projeto.

Ao Departamento de Genética, em especial ao Claudio Segatelli, ao Laboratório de Plantas Alóginas do prof Dr. Roberto Fritsche Neto pela cessão do espaço, equipamentos e à colega Miriam Vidotti pelo auxílio em análises.

Aos colegas de pós-graduação pelo incentivo, amizade e por compartilharem ideias, além dos secretários Cacá e Luciane, pelos auxílios e amizade.

À empresa Semillas Fitó e colegas de trabalho André Hirano, Bill Kazokas, Langdon Sarmiento e Toni Cabrero, que me incentivaram nesta jornada da pós graduação.

A todos aqueles que não foram citados mas que contribuíram de alguma forma para que o projeto fosse concluído, a minha gratidão eterna.

Epigrafe

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	12
INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS DO MILHO DOCE	15
1.2. <i>AZOSPIRILLUM BRASILIENSE</i> : ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS DE INTERESSE AGRÍCOLA	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. SEMENTES	21
2.2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL	21
2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS	22
2.3.1. <i>Inoculação de Azospirillum brasiliense nas sementes de milho doce</i>	24
2.4. AVALIAÇÕES DO PARÂMETRO FISIOLÓGICO DAS SEMENTES	24
2.5. AVALIAÇÕES EM CAMPO	26
2.5.1. <i>Avaliação de raízes</i>	26
2.5.2. <i>Avaliação da parte aérea das plantas</i>	26
2.5.3. <i>Avaliação qualitativa-frutos</i>	27
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. INTERFERÊNCIA DO <i>AZOSPIRILLUM BRASILIENSE</i> NA QUALIDADE DAS SEMENTES	29
3.2. DESENVOLVIMENTO RADICULAR	33
3.3. DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA	39
3.4. AVALIAÇÃO QUALITATIVA-FRUTOS	48
4. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	67

RESUMO

***Azospirillum brasiliense*: interferências na qualidade das sementes e no desenvolvimento das plantas de milho doce**

A associação da adubação nitrogenada com bactérias diazotróficas como o *Azospirillum brasiliense* pode favorecer o estabelecimento da planta em campo, além de constituir complemento nutricional para a planta de milho doce (*Zea mays* L. grupo saccharata). Os objetivos do trabalho foram: avaliar a interferência da inoculação de diferentes doses do produto comercial Azomax (*Azospirillum brasiliense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6) na qualidade das sementes de milho doce, especialmente a germinação e o vigor e a interferência da inoculação no estabelecimento da planta em campo, avaliando desde a emergência da plântula até a maturação da planta, associada a adubação nitrogenada. As sementes foram inoculadas nas doses de 0 (controle), 2, 4 e 8 mL de *Azospirillum*/kg de sementes e em campo, combinadas a níveis de adubação nitrogenada de 80, 120, 160 e 200 kg de nitrogênio por hectare (blocos casualizados, esquema fatorial). A inoculação das sementes de milho doce com a bactéria *Azospirillum brasiliense* favoreceu o desenvolvimento radicular alterando o comprimento de raízes, diâmetro médio e massa de matéria seca; favoreceu o desenvolvimento da parte aérea proporcionando variações no teor de clorofila, diâmetro de colmo e teor de nitrogênio e apesar de não resultar em aumentos significativos da produtividade, influenciou no aumento do número de fileiras de grãos. A inoculação com *Azospirillum* por quilograma de não prejudicou a qualidade das sementes por até 60 dias após a inoculação.

Palavras-chave: *Zea mays* L. grupo saccharata; Tratamento biológico da semente; Nitrogênio

ABSTRACT

***Azospirillum brasiliense*: effects on seed quality and plant development of sweet corn**

The association of nitrogen fertilization with the inoculation of diazotrophic bacteria, such as *Azospirillum brasiliense*, might favor the plant establishment in the field and can work as a nutritional complement for sweet corn plants (*Zea mays* L. saccharate group). Taking from this combined action, the objective of this research was to evaluate the development and productivity of the sweet corn plant as a function of the inoculation and nitrogen fertilization in a randomized block design in a factorial scheme (4 x 4), 80, 120, 160 and 200 kg of nitrogen / ha) and 0, 2, 4 and 8 mL of *Azospirillum* / kg of seeds, with four replicates for each treatment. The inoculation of sweet corn seeds with *Azospirillum brasiliense* favored root development by increasing its length, diameter and amount of dry matter; favored the development of the plant by increasing content of chlorophyll, stem diameter and nitrogen content and despite not affecting significantly the yield of the plant increased number of grain rows. The application of *Azospirillum* have not caused negative effects on seed storage up to 60 days after inoculation.

Keywords: *Zea mays* L. Saccharata group; Biological seed treatment; Nitrogen

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações das sementes de milho doce, em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (avaliações imediata e após 60 dias, ano de 2016): germinação (G), emergência da plântula areia (EP), primeira contagem (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC).....	29
Tabela 2. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações das sementes de milho doce, em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (avaliações imediata e após 60 dias, ano de 2017): germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC).....	29
Tabela 3. Resultados das avaliações das sementes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (avaliações: imediata e após 60 dias, ano de 2016): germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem do teste de germinação (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC).	31
Tabela 4. Resultados das avaliações das sementes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (avaliações: imediata e após 60 dias, ano de 2017): germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem do teste de germinação (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC)	32
Tabela 5. Quadro da análise de variância, referente aos resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: comprimentos das raízes muito finas (CRMF), finas (CRF), grossas (CRG) e comprimento total das raízes (CRT), diâmetro médio das raízes (DRT), área superficial das raízes (ART), volume total das raízes (VRT) e massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2016/2017.....	34
Tabela 6. Quadro da Análise de Variância, referente aos resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura : Comprimento de raízes muito finas (CRMF), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2017/2018.....	34
Tabela 7. Resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de raízes muito finas (CRMF), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2016/2017.....	35
Tabela 8. Desdobramentos: doses de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZ) dentro de doses de nitrogênio (N). Médias dos componentes das avaliações das raízes: comprimentos das raízes muito finas (CRMF, expresso em %), finas (CRF, %) e grossas (CRG, %), diâmetro das raízes (DRT, expresso em cm), área superficial de raízes (ART, expresso em cm ²), Volume de raízes (VRT, em m ³) e massa de matéria seca de raízes (MR, expresso em gramas) relacionados às plantas de milho doce produzidas no ano agrícola 2016/2017.	36
Tabela 9. Resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de raízes muito finas (CRMF), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2017/2018.....	37
Tabela 10. Desdobramentos: doses de <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) dentro de doses de nitrogênio (N). Médias dos componentes das avaliações das raízes: comprimentos das raízes muito finas (CRMF, expresso em %), finas (CRF, %) e grossas (CRG, %), diâmetro das raízes (DRT, expresso em cm), área superficial de raízes (ART, expresso em cm ²), Volume de raízes (VRT, em m ³) e massa de matéria seca de raízes (MR, expresso em gramas) relacionados às plantas de milho doce produzidas no ano agrícola 2017/2018.	38

Tabela 11. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea das plantas de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N): Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.40

Tabela 12. Resultados das avaliações dos componentes da parte aérea das plantas de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.41

Tabela 13. Desdobramentos dos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.42

Tabela 14. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura : Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.44

Tabela 15. Resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.45

Tabela 16. Desdobramentos dos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N): Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.46

Tabela 17. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações na colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.49

Tabela 18. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações na colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.49

Tabela 19. Resultados das avaliações dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.50

Tabela 20. Resultados das avaliações dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.51

Tabela 21. Desdobramentos dos resultados dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.52

Tabela 22. Desdobramentos dos resultados dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de Espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018..... 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de satélite de ambas as áreas experimentais, situadas dentro do campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). À esquerda, está representada a área utilizada na safra de 2016, e à direita, referente ao experimento cultivado em 2017.21

Figura 2. Dados climáticos referentes a cidade de Piracicaba, SP: Temperatura média (T med), temperatura máxima (T max) e temperatura mínima (T min), em graus Celsius (oC) e Precipitação (mm) referente aos anos agrícolas de 2016 a 2018, período em que foram conduzidos os experimentos. Fonte: Série de Dados Climatológicos ESALQ/USP22

INTRODUÇÃO

O milho doce (*Zea mays* L. grupo *saccharata*) diferencia-se do milho comum devido à presença de genes mutantes que afetam a biossíntese de carboidratos e, consequentemente, há no endosperma o acúmulo de açúcares ao invés do amido (NAKAGAWA et al. 2012).

O principal genótipo cultivado no Brasil é do grupo mutante do tipo *sh2*, em função do mercado consumidor, porém há dificuldades quanto à qualidade das sementes, que originam plântulas frágeis e suscetíveis ao tombamento, especialmente em condições em que há a redução da temperatura do solo (FARIA; NASCIMENTO, 2014).

Devido ao teor de açúcares solúveis as sementes têm menos resistência aos danos e após secagem, têm alterações negativas relacionadas ao sistema de membranas celulares o que favorecem a associação com os fungos fitopatogênicos (GUISCHEM et al. 2001). Estes fatores contribuem para a redução rápida da qualidade da semente, comprometendo o estabelecimento da planta em campo; dessa forma, há problema de uniformidade, o que prejudica o rendimento e a colheita (STYER; CANTILIFFE, 1984).

É necessária a avaliação de técnicas associadas às sementes, visando maximizar a expressão do potencial genético (TRACY, 2001). Pesquisas desenvolvidas por Hungria (2011) enfatizaram os benefícios do uso de microrganismos promotores de crescimento, como as bactérias do gênero *Azospirillum*, em associação com as espécies vegetais. Em gramíneas, apresentam mecanismos que influenciam o desenvolvimento da planta e também a fixação biológica do nitrogênio, devido ao estímulo para a produção de fitohormônios como, por exemplo, as giberelinas, melhoria dos parâmetros fotossintéticos, da condutância estomática e da elasticidade da parede celular, alterando as variáveis de produção dessas plantas (ZUFFO et al. 2016).

RIVERA (2011) afirmou que a associação das sementes com promotores de crescimento, como os fitohormônios, pode reduzir a interferência de fatores adversos que interferem na qualidade das sementes. A giberelina, por exemplo, quando associada a outros tratamentos em pré-semeadura, aumenta, de forma significativa, a emergência da plântula, exercendo uma importante regulação hormonal nas sementes e induzindo a germinação de sementes de diversas espécies, inclusive milho (ANDREOLI; KAHN, 1993).

Devido às particularidades da semente de milho doce, é interessante o estudo da interação entre as bactérias promotoras de crescimento, como *Azospirillum*, e a qualidade dessas sementes, principalmente para as avaliações do parâmetro fisiológico das sementes e do desenvolvimento e da produtividade das plantas. A inoculação com diferentes estirpes e

associadas ao uso de nitrogênio proporcionam efeitos benéficos para plântulas *in vitro* considerando alguns genótipos de milho doce, o que poderia também ser avaliado para outros genótipos e em condições de campo (FARUQ et al. 2015).

Os objetivos do trabalho foram: (1) avaliar a interferência da inoculação de diferentes doses do produto comercial Azomax® (*Azospirillum brasiliense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6) na qualidade das sementes de milho doce, especialmente a germinação e o vigor; e (2) a interferência da inoculação das diferentes doses no estabelecimento da planta em campo, avaliando desde a emergência da plântula até a maturação da planta, associada à adubação nitrogenada em duas fases do ciclo da planta.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Características das plantas do milho doce

O milho doce (*Zea mays* L. grupo *saccharata*), da família das Poaceas ou Gramínea, tribo Maydeae e do gênero *Zea*, no Brasil é produzido principalmente para o processamento industrial e há restrição quanto à adaptação dos cultivares ao clima tropical (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016). Em outros países, como Estados Unidos e Canadá, é consumido como milho verde, portanto “in natura” (BORDALLO et al. 2005).

No Brasil o milho doce, juntamente com o milho verde, é considerado um produto hortícola e segundo a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2015) a área cultivada foi 44.010 hectares e representou o valor de US\$ 302,4 milhões em comercialização do produto final. A produção está concentrada nos estados de Goiás, seguido de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Maggio (2006) afirmou que essas áreas de produção estão associadas com a implantação da indústria de processamento do milho doce.

O milho doce tem alelos mutantes que bloqueiam a conversão dos açúcares em amido no endosperma, caracterizando o sabor doce. Para efeito prático, é classificado em dois grupos: superdoce (contendo o gene *Brittle* ou *Shrunken*) e doce (contendo o gene *Sugary*). É improvável que o milho doce tenha ocorrido na natureza como uma raça selvagem, similarmente aos outros tipos de milho, devido às dificuldades para a sobrevivência destas plantas por meio das sementes (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

O endosperma do milho contém os nutrientes necessários para a germinação da semente. A maioria do carbono e do nitrogênio utilizados nos estágios iniciais do desenvolvimento da plântula deriva do amido e das proteínas de reserva (SOUSA et al. 2012). As reservas nutricionais compõem aproximadamente 90% do peso da matéria seca do endosperma maduro. A produção e o acúmulo de proteínas e de amido iniciam-se entre 10 e 14 dias após a polinização (DAP) nas células da camada sub-aleurônica (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016). Esse acúmulo ocorre segundo gradiente crescente da região externa para o interior, coincidindo com diversos eventos de diferenciação celular (LUR; SETTER, 1993).

Na semente madura, o endosperma é diferenciado em duas partes: o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. As células da região central do endosperma acumulam amido e as regiões periféricas proteínas de reserva. No final da maturação da semente, o endosperma amiláceo transforma-se em um tecido mole e quebradiço, enquanto a região proteica torna-se dura e translúcida (SHEWRY; CASEY, 1999).

O sabor adocicado do milho doce decorre das variações das quantidades de amido e açúcares no endosperma. Essas variações são controladas geneticamente, os alelos que condicionam o fenótipo doce são recessivos para a maioria dos mutantes empregados comercialmente. Foram identificados quatorze genes relacionados ao milho-doce e oito desses locos já foram usados comercialmente (TRACY, 2001). Os de maior potencial comercial no momento são conhecidos como superdoce, portadores do gene *shrunk-2* (*sh2*) (YOUSEF; JUVIK, 2002) e *brittle-2* (*bt2*) (BREWBAKER; BANAFUNZI, 1975; BREWBAKER, 1977), ou ainda combinações com os genes *ae1*, *du1*, *wx1* empregadas por Garwood e Creech (1979).

O milho comum desenvolvido e maduro tem 3% de açúcares e entre 60% e 70% de amido, enquanto o milho doce tem de 9% a 14% de açúcar e de 30% a 35% de amido e o superdoce (*shrunk-2*), mais importante comercialmente, tem em torno de 25% de açúcar e de 15% a 25% de amido (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Em relação aos estádios de desenvolvimento da semente, de acordo com Hunter et al. (1991) a classificação para o milho é: estágio 1 caracterizado pela ausência de pigmentação na base do endosperma; estágio 2 quando a região entre o embrião e a placenta- chalaza tem uma aparência translúcida; estágio 3 em que o tecido entre a base do embrião e a região pedicelo-placenta é mais fina e escura do que no estágio 2; estágio 4 o grão tem uma fina borda fina e marrom escura em toda a base da semente e o estágio 5 que corresponde ao completo desenvolvimento da camada preta em toda a base da semente.

A colheita das espigas, considerando a comercialização para indústria, deve ser realizada no estágio R3, que corresponde aos 19 e 23 dias após a polinização ou estágio 3. É importante que os grãos tenham entre 70% e 80% de água para melhorar o rendimento industrial (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007).

A concentração reduzida do amido no milho doce, aliada às concentrações de açúcares solúveis do endosperma, proporciona a formação de espaços internos vazios entre a camada de aleurona e o pericarpo das sementes durante o período de desidratação, tornando-as enrugadas, o que torna o pericarpo frágil e suscetível aos danos mecânicos e facilita a entrada de patógenos (CHEN, 2014). Com isso, a deterioração das sementes do milho doce no campo é mais rápida, em comparação com a dos demais tipos de milho.

O parâmetro fisiológico das sementes de milho doce pode também ser afetado por danos térmicos durante a secagem, o que pode ser verificado logo após esse processo (efeito imediato), ou somente após determinado período de tempo (efeito latente), uma vez que as

temperaturas entre 50°C e 60°C associadas à umidade relativa do ar podem reduzir a qualidade das sementes, conforme relataram Araujo et al. (2000).

Devido a estas particularidades das sementes de milho doce é desejável que técnicas relacionadas à germinação da semente e ao desenvolvimento da plântula sejam testadas, visando a manutenção do vigor das sementes e obtenção de plântulas uniformes, proporcionando o desenvolvimento adequado em campo até a fase final de produção.

1.2. *Azospirillum brasiliense*: associação com plantas de interesse agrícola

Azospirillum brasiliense é uma bactéria gram negativa classificada como diazotrófica, sendo este grupo filogenético caracterizado pela capacidade de fixar nitrogênio (MOREIRA et al. 2010). Estes microrganismos existem livremente em diversos ecossistemas, em simbioses ou associados às plantas no interior dos tecidos das mesmas, vivendo endofiticamente nos espaços intercelulares. Neste último caso são denominados diazotróficas associativas.

A identificação das bactérias do tipo diazotróficas é baseada no isolamento de genes responsáveis pela síntese da enzima nitrogenase, responsável pela catálise da reação que transforma o nitrogênio atmosférico em amônia, ou pela medição da atividade da nitrogenase usando a técnica da redução do acetileno (ROESCH, 2007). Entre os principais filos bacterianos descritos atualmente, é possível detectar pelo menos seis com a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. O *Azospirillum* pertence ao filo das Proteobactérias, que tem mais microrganismos que fixam o nitrogênio atmosférico, essa associação já foi confirmada com as gramíneas, na simbiose com as leguminosas e em vida livre no solo (RAYMOND, 2004).

O gênero *Azospirillum* é classificado como endofítico facultativo e apresenta um metabolismo versátil, com características adaptativas e possibilitando, assim, o estabelecimento competitivo na rizosfera (STEENHODT; VANDERLEYDEN, 2000). Dessa forma, favorecem o crescimento de mais de 100 espécies de cereais e leguminosas (BASHAN; BASHAN, 2004).

Espécies de bactérias diazotróficas associativas foram isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola, tais como algumas gramíneas e palmeiras (MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984; DÖBEREINER, 1992; BALDANI et al. 1997; FERNANDES et al. 2001; SALA et al. 2005), orquídeas (LANGE; MOREIRA, 2002), tubérculos (PAULA et al., 1992; BALOTA, et al. 1997; 1999), cafeeiros (JIMÉNEZ-

SALGADO et al. 1997; SANTOS et al. 2001), araucárias (NERONI; CARDOSO, 2007) e fruteiras (RAO, 1983; WEBER et al. 1999).

Alguns destes diazotróficos colonizam o interior dos tecidos das plantas, e são denominados como bactérias endofíticas, que favorecem o aumento da disponibilidade do nitrogênio (BALDANI, et al. 1997) contribuindo para o aumento da fixação biológica; podem também atuar na solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzir hormônios vegetais (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al. 1989). Em todas estas formas, são benéficas e favorecem as condições do meio e o desenvolvimento das plantas.

As bactérias do gênero *Azospirillum* destacaram-se a partir da década de 1970 (DÖBEREINER; DAY, 1976), com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner, da capacidade de fixação biológica do nitrogênio por essas bactérias, quando associadas com as gramíneas. As estirpes utilizadas em formulações comerciais atualmente são: Abv-5 e Abv-6, selecionadas em diversos ensaios que avaliaram o potencial de sobrevivência no solo, o aumento do desenvolvimento das plantas e a adaptação às técnicas utilizadas para o cultivo do milho e do trigo (SALA et al. 2005). Resultados publicados por PANDOLFO et al. (2011), demonstram que o aumento da produtividade para as plantas de milho foi 26% e para as de trigo 31%, com o uso das estirpes Abv-5 e Abv-6.

As plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias diazotróficas (Baldani; Dobereiner, 1980; Baldani et al. 1986), sendo as bactérias dos gêneros *Azospirillum* um dos mais frequentes.

Na literatura existem vários trabalhos confirmando que *Azospirillum* produz fitohormônios, que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas. Tien et al. (1979), por exemplo, verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* foram auxinas (ácido indolacético), as giberelinas e as citocininas, hormônios diretamente envolvidos no crescimento das plantas de forma geral.

O aumento do desenvolvimento das raízes devido à inoculação com *Azospirillum* pode implicar em vários outros efeitos. Já foram relatados incrementos na absorção da água e dos minerais, na tolerância à salinidade e à falta da água resultando em uma planta vigorosa e produtiva (BASHAN; HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE et al. 2001; BASHAN; BASHAN, 2004). Correa et al. (2008) afirmaram que o aumento das raízes e das plantas, favorece a tolerância aos patógenos das plantas.

Diversos mecanismos de promoção de crescimento decorrentes destes microrganismos já foram relatados e os relevantes são a capacidade de fixação biológica de

nitrogênio (HUERGO et al. 2008), o aumento da atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN et al. 2008), a produção de hormônios como as auxinas e as citocininas (TIEN et al. 1979) as giberelinas (BOTTINI et al. 1989) e o etileno (STRZELCZYK et al. 1994) e uma variedade de outras moléculas (PERRIG et al. 2007), a solubilização do fosfato (RODRIGUEZ et al. 2004) e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (CORREA et al. 2008).

Em relação à promoção da síntese hormonal, diversos autores avaliaram a ação das bactérias do gênero *Azospirillum*. Cassán et al. (2008) verificaram que bactérias diazotróficas como *Azospirillum brasilense* produziram zeatina, giberelinas e ácido indolacético em concentrações suficientes para promover alterações fisiológicas em sementes de milho. Conforme relatado por RIVERA et al. (2011), a aplicação de giberelinas tem incidência positiva sobre sementes de milho doce quando estas são utilizadas imediatamente após a aplicação ou em até 60 dias após a exposição ao hormônio.

Segundo Aragão et al. (2003) o uso de reguladores vegetais em sementes de várias espécies vegetais favorece o desenvolvimento das plântulas, acelerando a velocidade de emergência. Avaliando sementes de milho doce, verificaram melhoria da germinação das sementes tratadas com giberelinas, quando comparadas ao controle. Aragão (2002) ao avaliar sementes de milho doce, também verificou efeitos positivos na uniformidade das plântulas cujas sementes foram tratadas com giberelinas (GA3) e relatou efeito favorável na velocidade e na porcentagem de germinação. Estes resultados são similares aos obtidos por Sanwo e DeManson (1994) os quais verificaram que a aplicação de giberelina exógena induziu um aumento da atividade da α -amilase em sementes de milho doce sh2, produzindo efeitos positivos na germinação.

Piccoli e Bottini. (1994) verificaram a capacidade de espécies de *Azospirillum* em metabolizar giberelinas em meio de cultivo quimicamente definido. Outros resultados obtidos por Piccoli e Bottini (1996) reafirmaram os resultados obtidos anteriormente sobre a capacidade da mesma cepa bacteriana em metabolizar outras giberelinas com atividade biológica (GA3 e GA9). Este conjunto de resultados indica que a promoção do desenvolvimento das plantas inoculadas é devida, em grande parte, a atividade bacteriana na síntese de precursores de giberelinas, além de outros hormônios vegetais.

Em plantas mutantes para o nanismo, cuja alteração é controlada por genes que impedem a síntese de hormônios como giberelinas, a reversão pode ser realizada pela aplicação exógena deste hormônio. Lucangeli e Bottini (1996) avaliando a inoculação de plântulas de milho e arroz mutantes (genes d1- dwarf-1 e dx- dwarf-x, respectivamente) com

Azospirillum lipoferum e *Azospirillum brasiliense* observaram que a associação com estes microrganismos foi eficiente na reversão do nanismo, demonstrando o efeito destas bactérias como produtoras de hormônios, principalmente no que diz respeito às giberelinas.

Este efeito promotor na síntese de hormônios é interessante do ponto de vista da qualidade de sementes, visto que a germinação inicia-se, dentre outros processos, com a ativação de giberelinas na camada de aleurona, causando a hidrólise dos compostos de reserva e, conseqüentemente, possibilitando a germinação. Desta forma, o uso de compostos biologicamente ativos, como reguladores de crescimento podem diminuir o impacto de fatores adversos na qualidade e desempenho das sementes (ANDREOLI; KHAN, 1993, 1999).

Considerando outros parâmetros de desenvolvimento das plantas, Barassi et al. (2008) afirmaram que a inoculação com bactérias *Azospirillum* favoreceu os parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e a condutância estomática, o teor de prolina na parte aérea e nas raízes, o potencial hídrico, o incremento do teor de água do apoplasto, o aumento da elasticidade da parede celular, o aumento da produção de biomassa e do comprimento das plantas.

A utilização destes microrganismos possibilita o aumento do rendimento das plantas e a redução dos impactos ambientais decorrentes da utilização dos fertilizantes nitrogenados e a interferência da disponibilização do *Azospirillum* spp., para o desenvolvimento da planta do milho e de outras gramíneas, foi pesquisada por Bashan et al. (2006), Barassi et al. (2008), Cassán et al. (2009), Hungria et al. (2010), Braccini et al. (2012) não só quanto ao rendimento das plantas, mas, também, em relação às causas fisiológicas que possibilitam o aumento do rendimento e que a aplicação de *Azospirillum* contribuiria para o melhor aproveitamento do nitrogênio, reduzindo sua aplicação na planta. Os efeitos de crescimento proporcionados pela associação com *Azospirillum* podem estar relacionados, portanto, com a produção hormonal e também pelo suprimento de nitrogênio (TIEN et al. 1979).

Aparentemente, a inoculação de *Azospirillum* spp. pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogênio, na ordem de 20% a 50% sendo que resultados superiores já foram obtidos quando a inoculação foi utilizada juntamente com a incorporação de fertilizantes orgânicos (BASHAN; BASHAN, 2004).

Na literatura não há informações sobre a associação entre as sementes de milho doce e o *Azospirillum brasiliense*. Dessa forma, nesta pesquisa foi avaliada a aplicação do *Azospirillum brasiliense* nas sementes de milho doce em relação às interferências deste microrganismo na qualidade das sementes e das plântulas, avaliadas em laboratório, e das plantas, avaliadas em campo, associado a adubação nitrogenada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sementes

As sementes de milho doce utilizadas nessa pesquisa foram as do cultivar “BC 2158 F1, provenientes de dois lotes, desprovidas de tratamentos químico e biológico cedidas pela empresa Agristar do Brasil LTDA”.

2.2. Caracterização da Área experimental

O experimento foi conduzido em duas safras nos anos de 2016 e 2017. Ambos os experimentos foram implementados em áreas experimentais situadas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Figura 1). No primeiro ano, o experimento foi semeado em gleba cuja localização é representada pelas coordenadas 22°42'50.562"S e 47°37'15.719"O e na safra seguinte, em área próxima, cuja localização é representada pelas coordenadas: 22°42'12.193"S 47°38'8.995"O.

Figura 1. Imagens de satélite de ambas as áreas experimentais, situadas dentro do campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). À esquerda, está representada a área utilizada na safra de 2016, e à direita, referente ao experimento cultivado em 2017.

Aos 60 dias que antecederam os experimentos, para ambas as safras, amostras de solo foram retiradas para análise e determinação dos parâmetros físico-químicos, os quais foram levados em consideração nos cálculos de adubação posteriores.

A área utilizada em 2016 estava em pousio há seis meses e como cultivo anterior, teve milho safrinha. O solo é considerado arenoso, com 68% de areia, 21% de argila e 11% silte, pH em CaCl_2 de 5,2, teor de matéria orgânica de 7 g dm^{-3} , fósforo em resina de 14 mg dm^{-3} , potássio, cálcio e magnésio representados por: $1,6 \text{ mmol}_c\text{dm}^{-3}$, $10 \text{ mmol}_c\text{dm}^{-3}$ e 6

$\text{mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$, respectivamente. A CTC (capacidade de troca catiônica) caracterizada por $38 \text{ mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$, saturação por Bases de 47% e a saturação por alumínio, nula.

A gleba utilizada em 2017 teve como cultivo anterior feijão. A textura do solo é média, representado por 52% de argila, 32% de areia e 16% silte. O pH em CaCl_2 de 5,1, teor de matéria orgânica de 18 g dm^{-3} , fósforo em resina de 32 mgdm^{-3} , potássio, cálcio e magnésio representados por: $4,9 \text{ mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$, $27 \text{ mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$ e $1,3 \text{ mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$, respectivamente. A CTC, $79 \text{ mmol}_\text{c}\text{dm}^{-3}$, saturação por bases de 57%, sendo a saturação por alumínio também nula.

Na primeira safra não houve a necessidade de irrigação, pois o regime de chuvas foi suficiente para suprir as necessidades hídricas da cultura. Em 2017 foi fornecida irrigação apenas nos primeiros 20 dias após a semeadura, até completar a fase de emergência (VE) devido a ocorrência de veranico, e as chuvas provenientes do verão foram suficientes para suprir as necessidades hídricas da cultura (Figura 2).

Figura 2. Dados climáticos referentes a cidade de Piracicaba, SP: Temperatura média (T med), temperatura máxima (T max) e temperatura mínima (T min), em graus Celsius (°C) e Precipitação (mm) referente aos anos agrícolas de 2016 a 2018, período em que foram conduzidos os experimentos. Fonte: Série de Dados Climatológicos ESALQ/USP

2.3. Caracterização dos Tratamentos

Os tratamentos foram estabelecidos em função das aplicações de *Azospirillum brasiliense* (Azomax®) nas sementes de milho doce, definidos pelo Controle e as doses de 2, 4 e 8 mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes, combinadas à adubação nitrogenada, correspondentes às quantidades de 80, 120, 160 e 200 kg de nitrogênio por hectare.

Para a adubação do experimento foram utilizados adubos de formulação simples, combinados entre si, sendo as fontes: uréia, contendo 45% N; Superfosfato simples, 18% P_2O_5 e cloreto de potássio, 60% de K_2O .

As aplicações de nitrogênio foram na semeadura e as outras duas em cobertura, nos estádios V5 e V7 da planta. Foram fornecidos 40 kg/ha de nitrogênio para todos os tratamentos no plantio e quantidade restante de nitrogênio foi parcelada duas vezes em cobertura, variando de acordo com a dose considerada.

Portanto, para os tratamentos que receberam 80kg totais de nitrogênio por hectare, aplicou-se: 40 kg na semeadura, 20 kg na primeira cobertura (V5) e os 20 kg restantes na segunda cobertura (V7); para a adubação de 120 kg de nitrogênio por hectare foram 40kg (semeadura), 40kg e 40 kg em V5 e V7, respectivamente; para os tratamentos que receberam 160 kg de nitrogênio por hectare, aplicou-se os 40 kg na semeadura, 60 kg e 60 kg nas demais coberturas e a adubação de 200 kg/ha recebeu os 40 kg na semeadura, 80 kg e 80kg nas coberturas, conforme citado.

A aplicação de fósforo foi calculada baseando-se na textura do solo, quantidade disponível e necessidade da cultura, que para o milho doce é representado por 120 kg de P_2O_5 por hectare. (Coelho, 2007). Na área experimental de 2016 o teor de P_2O_5 foi considerado baixo e portanto foram fornecidos os 120 kg de P_2O_5 pela adição de 667 kg/ha do fertilizante supersimples. A área utilizada em 2017 caracterizou-se pelo teor elevado de fósforo, sendo assim foram fornecidos 70 kg de P_2O_5 na ocasião da semeadura, pela colocação de 390 kg de fertilizante Supersimples. Para o potássio, a cultura extrai cerca de 60 kg/ha de potássio (Coelho, 2007), e dessa forma foram fornecidos 100 kg do fertilizante Cloreto de Potássio (KCl) parcelados em duas épocas: plantio e estágio reprodutivo (R1).

As referidas recomendações em quilograma por hectare foram convertidas em gramas por metro e, posteriormente, por linha da parcela. Assim, para cada dose de N, P e K foram utilizados copos com marcações de acordo com a dose considerada, para cada um dos nutrientes; a aplicação dos adubos foi manual e realizada na base da planta.

Para o cálculo da quantidade de nitrogênio a ser fornecida e considerando que a fonte utilizada foi Ureia (45% N), procedeu-se da seguinte forma: 40 kg de nitrogênio por hectare são fornecidos pela aplicação de 88,90 kg de uréia; com o espaçamento de 0,6 metro entre linhas, e portanto, 16.667 metros um total de 5,33 gramas de ureia por metro e multiplicando por 6, o valor obtido foi de 32 gramas de nitrogênio por linha da parcela. O mesmo procedimento foi adotado para os cálculos das quantidades de fósforo e potássio.

2.3.1. Inoculação de *Azospirillum brasiliense* nas sementes de milho doce

O produto comercial utilizado para aplicar nas sementes de milho doce foi Azomax® (*Azospirillum brasiliense* estirpes abv-5 e abv6, na concentração de 2×10^8 UFC/mL, novozymes - Monsanto do Brasil).

Logo após o recebimento das sementes no laboratório, a amostra foi homogeneizada, conforme consta nas Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009) e dividida em quatro partes iguais para compor cada um dos tratamentos descritos e, em seguida, foram colocadas em embalagens de papel. A massa de cada uma das partes correspondeu a 0,850 kg e este valor foi utilizado para determinar a quantidade de Azomax® a ser inoculada, visando obter as dosagens citadas.

As sementes foram colocadas dentro de embalagens plásticas e inoculadas por meio de micropipetas automáticas, nas quais foi colocada a quantidade exata de inoculante por dose, diluído e homogeneizado em 50 mL de água destilada para facilitar a distribuição nas sementes. A inoculação foi realizada em condições controladas no laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Microbiologia, da USP, ESALQ, e após a adição do Azomax à massa das sementes, este conjunto foi agitado manualmente por três minutos, para assegurar a uniformidade da distribuição do produto, conforme indicado por Hungria (2011).

Após a inoculação, as sementes tratadas foram destinadas aos experimentos desta pesquisa, em campo e laboratório. A quantidade de sementes para a instalação do experimento de campo foi calculada considerando a viabilidade das sementes e a população de em 60 mil plantas por hectare; assim, foram estimadas 3 plantas por metro para cada parcela que tinha cinco linhas de seis metros, espaçadas de 0,6 metros entre linhas.

A pesquisa do laboratório foi composta por duas etapas: primeiro foram avaliados os efeitos da inoculação com *A. brasiliense* com as doses citadas em relação ao parâmetro fisiológico das sementes, logo após a aplicação do produto e aos 60 dias após a aplicação do produto.

2.4. Avaliações do parâmetro fisiológico das sementes

Germinação: cinco repetições de 50 sementes foram distribuídas em caixas plásticas, sobre papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa seca, e mantidas a 25 °C. As contagens foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a

instalação e as avaliações efetuadas segundo os critérios estabelecidos pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais.

Primeira contagem do teste de germinação: realizada juntamente com o teste de germinação e consistiu no registro do número de plântulas normais obtido no quarto dia após a semeadura do teste de germinação. Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais.

Envelhecimento acelerado: as sementes de milho doce foram distribuídas em uma camada única sobre uma tela metálica, colocada no interior de caixas plásticas (11 x 11 x 3 cm), contendo 40 mL de água no fundo. Os recipientes foram mantidos a 41 °C em incubadora BOD, durante 96 horas. Ao término do período de 96 horas, cinco repetições de 50 sementes foram utilizadas para a realização do teste de germinação, conforme descrito anteriormente e com avaliação única, no quarto dia após a instalação do teste de germinação. Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais.

Emergência e velocidade de emergência da plântula: avaliadas com cinco repetições de 50 sementes de tratamento, semeadas em caixas contendo areia, a 0,5 cm de profundidade. As caixas foram mantidas em casa de vegetação e com irrigação suplementar. Diariamente foram determinados os números de plântulas normais emersas, do 1º ao 7º dia após a semeadura, para o cálculo do índice de velocidade de emergência da plântula (Maguire, 1962).

Teste de frio: realizado com cinco repetições de 50 sementes, semeadas em caixa plástica contendo uma mistura de areia e solo, umedecida com água em quantidade equivalente a 60% da capacidade de retenção de água por esse substrato. Em seguida, as caixas foram mantidas a 10°C, por sete dias. Após esse período, as caixas foram transferidas para ambiente natural, por sete dias. Para a avaliação foi considerada a quantidade de plântulas emersas e o resultado expresso em porcentagem.

Emergência da plântula em campo: avaliada após a estabilização da emergência das plântulas, no centro da parcela em quatro linhas com dois metros cada. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas, avaliados aos vinte dias após semeadura.

2.5. Avaliações em campo

2.5.1. Avaliação de raízes

Desenvolvimento das raízes e produção de biomassa: foram coletadas duas plantas por parcela, no estágio V₆ para a avaliação das seguintes variáveis biométricas: volume radicular (VR) expresso em cm³; comprimento total de raízes (CTR) em centímetros, resultante da somatória dos comprimentos individuais das raízes; comprimento de raízes por classes: muito finas (CRMF), finas (CRF) e grossas (CRG) de acordo com a classificação de Bohm (1979), expressos em porcentagem; massa matéria seca de raiz (MSR) expressa em gramas e massa matéria seca da parte aérea (MSPA) em gramas. Para a obtenção do VR e CTR as amostras foram analisadas por meio do programa computacional WinRhizo[®]. Após a análise por meio do software, as raízes e parte aérea foram colocadas em estufa com circulação forçada do ar, à temperatura de 65 ° C por 72 horas e, em seguida, pesadas em balança de precisão analítica para obtenção da massa de matéria seca de raízes (MSR) e massa de matéria seca da parte aérea (MSPA). Os resultados foram expressos em: comprimento total de raiz (cm), área de superfície de raiz (cm²), e comprimento de raiz por classe de diâmetro (cm). As raízes foram classificadas em três classes de diâmetro, como descrito a seguir: raízes muito finas ($\emptyset$ inferior a 0,5 mm), raízes finas ($> 0,5 \emptyset < 2,0$ mm) e raízes grossas ($\emptyset > 2,0$ mm) e os resultados foram expressos em porcentagem, obtida pela divisão do comprimento de cada classe (em cm) pelo comprimento total (cm). A definição destas classes foi baseada na classificação de raízes proposta por Bohm (1979).

2.5.2. Avaliação da parte aérea das plantas

Altura da planta: determinada manualmente, utilizando uma trena, e o comprimento da planta foi medido da base do solo até a base da última folha nos estádios V₈ e V₁₂, em dez plantas por parcela. Os resultados foram expressos em metros por planta.

Teor relativo de clorofila: avaliado por meio de dispositivo eletrônico SPAD (*Soil plant analysis development*) do fabricante Konica Minolta. Os valores calculados pelo equipamento tomam como base a quantidade de luz transmitida pela folha, em dois comprimentos de ondas, com diferentes absorbâncias da clorofila (MINOLTA, 1989). Os valores obtidos são proporcionais ao teor de clorofila presente na folha. As leituras foram realizadas nos estádios V₈ e V₁₂ em 10 plantas por parcela, no terço superior da última folha

expandida, com três leituras por planta uma em cada lado da nervura e a 1 centímetro da margem da folha. Os resultados foram expressos em unidades SPAD.

Teor de nitrogênio nos tecidos foliares: as folhas para diagnose foram coletadas na época do florescimento (estádio R1), sendo retirada a folha da base da espiga na região do terço médio, segundo o método descrito por CANTARELLA et al. (1996). Foram avaliadas doze plantas por parcela. O material foi lavado com água corrente e solução de detergente, 1 mL L⁻¹, seco em estufa com circulação e renovação forçada de ar a 65°C. Em seguida, foi moído e digerido para obtenção do extrato e determinação do teor de N, segundo método descrito por MALAVOLTA et al. (1997). Os resultados foram expressos em gramas de N/kg de tecido vegetal.

Diâmetro do colmo: avaliado em dez plantas por parcela, nos estádios V8 e V12, utilizando um paquímetro digital (Western WS8 DC-6) determinado a medida no ponto médio do segundo internódio do colmo acima da superfície do solo. Os resultados foram expressos em centímetros por planta.

2.5.3. Avaliação qualitativa-frutos

Para a determinação dos componentes da produção das plantas do milho doce foram colhidas, aleatoriamente, 10 espigas da área útil de cada parcela experimental. Os resultados foram expressos em: umidade dos grãos na colheita (%), o comprimento da espiga (cm), o diâmetro da espiga (mm), a massa da matéria verde de espigas sem palha (g) e número de fileiras de grãos por espiga e o número de grãos por fileira. A produtividade foi estimada pela relação entre massa e número de grãos por espiga, multiplicados pela população de plantas de cada parcela, e corrigidos na base úmida de 15,5%.

2.6. Análise Estatística

Para as avaliações em campo, o delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial (4 x 4): doses de *Azospirillum brasiliense* nas sementes (0, 2, 4 e 8 mL/kg de sementes) x doses de nitrogênio (80, 120, 160 e 200 kg/ha), com quatro repetições. Cada parcela foi composta de 5 linhas de 6 metros, espaçadas de 0,60m entre si. O estande final estabelecido foi de 3 a 4 plantas por metro, baseando nas recomendações para o

híbrido BC 2158 F1 utilizado, a época do ano considerada (verão) e a região de Piracicaba, SP.

Para as análises em laboratório, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, e os seguintes tratamentos: controle (sem *Azospirillum*), 2mL/kg, de 4mL/kg e 8mL/kg.

Os dados obtidos em cada experimento foram analisados separadamente. Para os testes realizados em laboratório, a análise de estatística foi efetuada de acordo com delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Para os resultados das avaliações em campo, o delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial, com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise estatística para verificar o atendimento das pressuposições do modelo pelos testes Levene, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Interferência do *Azospirillum brasiliense* na qualidade das sementes

Os resultados das análises da variância referentes às avaliações da qualidade das sementes de milho doce estão indicados nas Tabela 1 (ano de 2016) e Tabela 2 (ano de 2017).

No experimento referente ao ano 2016 (Tabela 1), imediatamente após a inoculação das sementes de milho doce, houve diferenças estatísticas significativas apenas para os resultados do teste de germinação, enquanto que após os 60 dias houve variação estatisticamente significativa para os resultados do teste de germinação, da emergência da plântula e do índice de velocidade de emergência da plântula, sem variações estatísticas significativas entre os demais resultados.

Tabela 1. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações das sementes de milho doce, em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (avaliações imediata e após 60 dias, ano de 2016): germinação (G), emergência da plântula areia (EP), primeira contagem (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC).

2016	Fonte de Variação	GL	G	EP	PC	IVE	EA	TF	EMC
Valores dos Quadrados Médios									
Imediata	<i>Azospirillum</i>	3	141,3*	48,7ns	14,6ns	14,4ns	40,8ns	209,1ns	23,5ns
	CV (%)		7,09	6,62	31,3	9,76	16,4	26,0	64,3
	Shapiro-Wilk (W)		0,98	0,97	0,98	0,94	0,94	0,96	0,91
	Teste F (Levene)		3,27	1,99	0,19	2,31	2,39	2,95	1,1
Após 60 dias	<i>Azospirillum</i>	3	137,8*	97,3*	17,3ns	12,8**	77,5ns	61,5ns	-
	CV (%)		8,39	5,66	22,5	5,34	23,3	29,9	-
	Shapiro-Wilk (W)		0,96	0,94	0,88	0,99	0,95	0,97	-
	Teste F (Levene)		2,36	0,41	1,80	0,88	2,02	2,26	-

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F

Em 2017, logo após a inoculação das sementes de milho doce houve variação, estatisticamente significativa, para os resultados dos testes de envelhecimento acelerado e de frio, enquanto que, após os 60 dias a maioria dos resultados teve diferença estatística significativa, exceto os de germinação e primeira contagem de plântulas (Tabela 2).

Tabela 2. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações das sementes de milho doce, em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (avaliações imediata e após 60 dias, ano de 2017):

germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC)

2017	Fonte de Variação	GL	G	EP	PC	IVE	EA	TF	EMC
Valores dos Quadrados Médios									
Imediata	<i>Azospirillum</i>	3	19,7ns	81,6ns	14,6ns	14,5ns	316,2**	117,4**	96,9ns
	CV (%)		3,80	6,014	31,31	9,59	17,54	9,88	11,371
	Shapiro-Wilk (W)		0,92	0,94	0,98	0,93	0,94	0,93	0,92
	Teste F (Levene)		0,97	1,06	0,19	2,11	0,99	1,60	2,51
Após 60 dias	<i>Azospirillum</i>	3	65,33ns	61,1**	17,3ns	11,5**	388,2*	218,3*	-
	CV (%)		6,03	3,86	22,56	4,99	16,35	11,97	-
	Shapiro-Wilk (W)		0,93	0,96	0,88	0,96	0,94	0,84	-
	Teste F (Levene)		0,81	0,32	1,80	0,62	0,65	0,006	-

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F

Os resultados do teste de germinação das sementes em 2016 (Tabela 3) indicaram que houve redução da qualidade das sementes nos tratamentos representados por 2mL/kg e 4mL/kg logo após a inoculação com a bactéria *Azospirillum*, e para os demais testes, não houve variação significativa entre os resultados nesta época.

Após os 60 dias de armazenamento as sementes tratadas com as doses de 4 mL/kg e 8mL/kg mantiveram a qualidade, fato evidenciado pelos resultados dos testes de germinação, da porcentagem de plântulas no teste de emergência em areia, primeira contagem e índice de velocidade de emergência. Para os resultados dos testes de envelhecimento acelerado e de frio não houve diferenças significativas entre o Controle e as sementes tratadas. A utilização de 2mL/kg não apresentou diferença em relação ao Controle para as variáveis analisadas, até os 60 dias de avaliação (Tabela 3). Houve redução do vigor das sementes decorrente do processo natural de deterioração das sementes, independentemente da inoculação com o *Azospirillum*

Os resultados da emergência da plântula em campo, que foi avaliada aos 20 dias após a semeadura, não diferiram estatisticamente em função dos tratamentos, porém foi observado que, em termos absolutos, as sementes inoculadas, especialmente com 8mL/kg, proporcionaram os maiores valores da quantidade de plântulas emersas, 41%, comparado a 34% do Controle e 37% das demais doses.

Tabela 3. Resultados das avaliações das sementes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (avaliações: imediata e após 60 dias, ano de 2016): germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem do teste de germinação (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC).

2016	Fontes de Variação	G	EP	PC	IVE	EA	TF	EMC
		----%----			-----%-----			
1. Imediata 06/12/2016	Controle	78a	85a	12a	10,0a	54a	58a	34a
	2mL/kg	73b	88a	16a	11,0a	48a	52a	37a
	4mL/kg	70b	81a	14a	10,2a	54a	57a	37a
	8mL/kg	79a	84a	13a	10,2a	52a	56a	41a
	CV (%)	7,09	6,62	29,31	9,76	16,41	11,13	25,39
2. Após 60 dias 06/02/2017	Controle	66b	79b	10b	10,0b	31a	46a	-
	2mL/kg	72b	75b	8b	9,8b	25a	48a	-
	4mL/kg	73a	84a	12a	10,2a	23a	48a	-
	8mL/kg	74a	84a	12a	10,2a	30a	50a	-
	CV (%)	8,39	5,66	20,58	5,34	23,34	15,77	

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para o ano 2017, Tabela 4, na avaliação imediatamente após a inoculação das sementes de milho doce, os resultados dos testes de envelhecimento acelerado e de frio foram estatisticamente inferiores aos do Controle. Aos 60 dias após a inoculação, os resultados destes testes indicaram as diferenças de qualidade entre as sementes de milho doce, destacando a redução do vigor das sementes inoculadas com 2 mL/kg e 4 mL/kg e, especialmente, para as inoculadas com 2 mL/kg que tiveram os menores resultados para todos os testes utilizados. A aplicação de 8 mL *Azospirillum*/kg evitou a redução da qualidade das sementes de milho doce, especialmente do vigor.

Tabela 4. Resultados das avaliações das sementes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (avaliações: imediata e após 60 dias, ano de 2017): germinação (G), emergência da plântula em areia (EP), primeira contagem do teste de germinação (PC), índice de velocidade de emergência da plântula (IVE), envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (TF) e emergência da plântula em campo (EMC)

2017	Fontes de Variação	G	EP	PC	IVE	EA	TF	EMC
		-----%-----					-----%-----	
1. Imediata 05/12/2017	Controle	79a	85a	12a	10,8a	50a	55a	38a
	2mL/kg	79a	88a	16a	11,0a	37b	45b	46a
	4mL/kg	82a	81a	14a	10,8a	32b	45b	47a
	8mL/kg	79a	84a	13a	10,9a	39b	45b	48a
	CV (%)	3,80	6,01	31,31	9,59	17,54	9,88	56,40
2. Após 60 dias 05/02/2018	Controle	81a	79b	10b	10,0b	46a	63a	-
	2mL/kg	75b	75b	8b	9,5b	33b	52b	-
	4mL/kg	80a	84a	12a	10,8a	32b	52b	-
	8mL/kg	73b	84a	12a	10,7a	49a	64a	-
	CV (%)	6,03	3,87	22,56	5,00	16,35	11,97	-

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Pereira (2014) avaliou os efeitos imediatos da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na qualidade sementes de milho doce, quando aplicou 4 mL/kg sementes e verificou que não houve diferenças significativas quanto à germinação, mas a inoculação favoreceu tanto a emergência da plântula e quanto a velocidade de emergência da plântula, o que foi também obtido nessa pesquisa, especialmente após 60 dias da inoculação (Tabelas 3 e 4), considerando as diferentes doses empregadas, quando comparadas ao Controle.

No entanto, Barilli et al. (2011), que avaliaram também a inoculação de *Azospirillum* em sementes de milho (*Zea mays* L.), não obtiveram diferenças nos resultados de germinação e do índice de velocidade de emergência da plântula, referentes às sementes inoculadas.

Para plantas de outras espécies, Vogel e Fey (2016) avaliaram a aplicação do *A. brasiliense* isolado e associado a outros produtos para o tratamento das sementes de tritcale *xTriticosecale* [*Secale x Triticum*], concluíram que a referida bactéria influencia positivamente na germinação destas sementes, no comprimento total da plântula e no comprimento e no número das raízes.

Cotrim et al. (2016) avaliou a aplicação de 2 mL/kg de sementes de *Azospirillum* spp. nas sementes de trigo, não obteve diferenças significativas para os resultados da germinação, mas verificou para os resultados dos testes de envelhecimento acelerado, primeira contagem e de frio. Ressaltou, ainda, que os efeitos podem variar de acordo com o genótipo utilizado para estudo. Outros autores, como Piccinin et al. (2015), também trabalhando com o mesmo inoculante, observaram acréscimos no vigor de sementes de trigo.

As avaliações das sementes de milho doce, em 2016 e em 2017, imediatamente após a inoculação, indicaram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, exceto para o teste de germinação, em 2016, no qual tanto o controle como a dose de 8mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes proporcionaram maior vigor às sementes quando comparados às demais doses. Em contrapartida, após os 60 dias de armazenamento, as diferenças entre os tratamentos acentuaram-se, e para os testes de germinação, emergência da plântula, primeira contagem e índice de velocidade de emergência da plântula diferiram significativamente, sendo que doses crescentes de *Azospirillum* na semente resultaram em maiores médias, especialmente para as inoculações com 4mL/kg e 8mL/kg.

Em ambos os anos de experimento, os resultados de emergência da plântula em campo não tiveram variação estatística significativa, porém, em termos absolutos, as sementes inoculadas com *Azospirillum* na dose de 8mL/kg destacaram-se em relação ao controle e demais doses consideradas.

3.2. Desenvolvimento radicular

As raízes são um importante componente funcional e estrutural da planta de milho (MAGALHÃES, 1995). Plantas com raízes bem formadas e mais desenvolvidas estarão mais preparadas a passar por situações de estresses e terão maiores chances de adaptar-se a diferentes condições ambientais. Em relação aos atributos avaliados, a presença de *Azospirillum* influenciou o desenvolvimento radicular das plantas nos dois anos de experimento, como também pode ser visto nas Tabelas 5 e 6, que contém as análises da variância para as variáveis em estudo.

No experimento realizado em 2016 apenas o comprimento de raízes finas não foi significativo em relação ao *Azospirillum*, sendo que os demais apresentaram diferenças.

Quanto ao nitrogênio, as variações das doses afetaram as raízes quanto ao comprimento total, o diâmetro médio das raízes, área superficial total e massa seca de raízes; para os demais não houve diferença significativa. Foram observadas também interações entre doses de N e *Azospirillum*, afetando o comprimento das raízes grossas, o total e a espessura, que representa o diâmetro das raízes.

Tabela 5. Quadro da análise de variância, referente aos resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: comprimentos das raízes muito finas (CRMf), finas (CRF), grossas (CRG) e comprimento total das raízes (CRT), diâmetro médio das raízes (DRT), área superficial das raízes (ART), volume total das raízes (VRT) e massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2016/2017.

ANO	Fonte de Variação	GL	CRMf	CRF	CRG	CRT	DRT	ART	VRT	MR
Valores dos Quadrados Médios										
2016	<i>Azospirillum</i>	3	28,4 *	10,7ns	44,8**	2849207**	0,0*	16192**	73,0*	2,8*
	Nitrogênio	3	15,0ns	3,8ns	8,2ns	1723679*	0,0*	11880*	52,8ns	1,9*
	AZ*N	9	23,5ns	15,6ns	13,8*	1131533*	0,0*	3637ns	11,2ns	1,0ns
	Blocos	3	19,1ns	10,2ns	3,0ns	977253ns	0,0ns	8735ns	45,8ns	0,9ns
	Kolmogorov		0,11	0,14	0,2	0,08	0,05	0,1	0,12	0,11
	F - Levene		1,2	1,4	1,6	0,9	1,1	0,9	1,1	1,22
	CV (%)		6,25	13,03	18,18	23,87	11,0	28,8	36,15	26,35

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F. Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a (F-Levene $p>0,01$).

Os resultados obtidos em 2017 indicaram a influência do *Azospirillum* nas variáveis analisadas, com exceção dos comprimentos das raízes finas e total e da área superficial. O nitrogênio afetou também o comprimento das raízes (muito fina, grossa e total), além da massa matéria seca das raízes, o que foi observado também nos resultados obtidos em 2016. Houve interação dos tratamentos para as variáveis diâmetro médio das raízes e massa da matéria seca da raiz, mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Quadro da Análise de Variância, referente aos resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura : Comprimento de raízes muito finas (CRMf), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2017/2018.

ANO	Fonte de Variação	GL	CRMf	CRF	CRG	CRT	DRT	ART	VRT	MR
Valores dos Quadrados Médios										
2017	<i>Azospirillum</i>	3	83,97*	4,56ns	62,06**	85235ns	0,73**	4247,7ns	84,83**	4,93**
	Nitrogênio	3	64,68*	16,1ns	18,35*	544268*	0,19ns	2884ns	17,42ns	1,54**
	AZ*N	9	40,29ns	15,76ns	11,02ns	284148ns	0,32*	1974ns	29,79ns	1,73**
	Blocos	3	207,4ns	93,35ns	22,23ns	407318ns	0,20ns	405,9ns	15,56ns	0,28ns
	Kolmogorov		0,09	0,11	1,2	0,05	0,17	0,09	0,11	0,09
	F - Levene		1,87	1,9	0,1	1,3	0,69	1,19	0,74	0,75
	CV (%)		7,44	14,4	19,76	25,32	26,64	58,93	33,52	14,38

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F. Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a (F-Levene $p>0,01$).

A Tabela 7 mostra as médias dos tratamentos referentes à inoculação com o *Azospirillum*, independentemente da dose de N aplicada no primeiro ano; assim, a aplicação de 4 mL/kg das sementes foi a que proporcionou resultados estatisticamente superiores em função do que foi avaliado, beneficiando as plantas com maiores valores de CRT (3460 cm/planta) em relação aos 2623 cm/planta do Controle (média de todos os tratamentos sem inoculação), representando 32% de aumento aproximadamente; além disso, os resultados da massa de matéria seca da raiz foram superiores nos tratamentos inoculados com a referida dose, tendo um acréscimo de 34,6% em relação aos que não foram inoculados. Em relação às quantidades de N empregadas, apesar de não haver diferenças estatísticas significativas, a dose de 200kg/ha foi a que proporcionou os melhores resultados para a maioria das variáveis analisadas.

Tabela 7. Resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de raízes muito finas (CRMf), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2016/2017.

Fonte de variação	Doses	CRMf	CRF	CRG	CRT	DRT	ART	VRT	MR
		%	%	%	(cm)	(cm)	(cm ²)	(m ³)	(g)
AZ (mL/kg)	S/Az	64,3a	22,9a	12,8b	2623b	0,78ab	187,1b	10,7b	2,6b
	2	65,3a	22,0a	12,4b	3030ab	0,70b	211,8ab	11,8ab	2,7b
	4	64,4a	21,0a	14,8ab	3460a	0,80ab	260,0a	15,7a	3,5a
	8	62,1b	22,0a	16,0a	2542b	0,85a	200,0b	12,5ab	2,7b
N (kg/ha)	80	64,9a	22,0a	13,0a	2643b	0,73ab	186b	10,5a	2,6b
	120	63,4a	22,3a	14,3a	3054ab	0,78a	228ab	13,6a	3,1a
	160	63,0a	22,2a	14,7a	2646b	0,73ab	199ab	12,0a	2,6b
	200	64,8a	21,2a	14,1a	3312a	0,79a	246a	14,7a	3,3a
Média Geral		64,0	22,0	14,0	2194,0	0,76	215,0	12,6	2,9

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para este mesmo ano, avaliando a interação da inoculação com *Azospirillum* dentro de cada dose de nitrogênio aplicada (Tabela 8), a dose de inoculante 4mL/kg apresentou resultados positivos dentro de todos os níveis de N considerados, sendo superior ao resultado do Controle na maior parte das avaliações e superando inclusive as demais doses de *Azospirillum* avaliadas, até a dose de 160 kg de N por hectare. Para a aplicação de 200 kg de N por hectare não houve diferença estatística significativa decorrente da inoculação com o *Azospirillum*, sendo que para maioria das variáveis analisadas, os resultados relacionados às

raízes das plântulas, originadas das sementes com e sem inoculação, não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Tabela 8. Desdobramentos: doses de *Azospirillum brasiliense* (AZ) dentro de doses de nitrogênio (N). Médias dos componentes das avaliações das raízes: comprimentos das raízes muito finas (CRMF, expresso em %), finas (CRF, %) e grossas (CRG, %), diâmetro das raízes (DRT, expresso em cm), área superficial de raízes (ART, expresso em cm²), Volume de raízes (VRT, em m³) e massa de matéria seca de raízes (MR, expresso em gramas) relacionados às plantas de milho doce produzidas no ano agrícola 2016/2017.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	CRMF	CRF	CRG	CRT	DRT	ART	VRT	MR
		%	%	%	(cm)	(cm)	(cm ²)	(m ³)	(g)
80	S/Az	64,8ab	21,0ab	14,0ab	2307a	0,8ab	172a	10,4a	3,1a
	2 mL/kg	66,3ab	24,0 ab	9,5b	2707a	0,6b	170a	8,4a	1,9a
	4 mL/kg	68,5a	18,5 b	13,3ab	3398a	0,7ab	236a	13,1a	3,2a
	8 mL/kg	60,0b	24,5a	15,3a	2159a	0,8a	166a	10,2a	2,1a
Médias 80		64,9	22,0	13,0	2643	0,7	186	10,5	2,6
120	S/Az	62,8a	25,0 a	11,8a	2270b	0,7a	160b	8,9a	2,0b
	2 mL/kg	63,2a	21,75a	14,5a	3377ab	0,8a	255ab	15,3a	3,5ab
	4 mL/kg	64,8a	21,0a	14,3a	3856a	0,7a	281a	16,2a	3,7a
	8 mL/kg	62,8a	20,8a	16,5a	2715ab	0,8a	219ab	14,0a	3,1ab
Médias 120		63,4	22,3	14,3	3054	0,7	228	13,6	3,1
160	S/Az	63,8a	22,5a	13,8a	2394b	0,7a	174a	10,1a	2,1b
	2 mL/kg	63,8a	22,5a	13,5a	2251b	0,7a	165a	9,5a	2,2ab
	4 mL/kg	63,8a	22,3a	13,8a	3777a	0,7a	278a	16,4a	3,6a
	8 mL/kg	60,8a	21,5a	17,8a	2164b	0,8a	179a	11,7a	2,5ab
Médias 160		63,0	22,2	14,7	2646	0,7	199	12,0	2,6
200	S/Az	65,8a	22,5a	11,8b	3522a	0,7b	243a	13,4a	3,3a
	2 mL/kg	67,8a	19,8a	12,3b	3785a	0,7b	258a	13,9a	3,2a
	4 mL/kg	60,8a	21,8a	17,8a	2809a	0,8a	245a	17,0a	3,5a
	8 mL/kg	65,0a	20,8a	14,5ab	3132a	0,7ab	237a	14,2a	3,1a
Médias 200		64,8	21,2	14,1	3312	0,7	246	14,7	3,3

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para comprimento total, a dose de 4mL/kg do inoculante proporcionou os maiores valores de comprimento até a dose de 160 kg/ha de N, sendo inferior ao resultado do Controle quando foram colocados 200 kg/ha; a porcentagem de raízes grossas foi maior nas plantas originadas das sementes inoculadas quando comparadas as do Controle, sendo que os valores máximos foram obtidos para a utilização de 8mL de *Azospirillum*/kg de sementes e o diâmetro das raízes foi beneficiado também pela inoculação, sendo superior ao Controle dentro das doses de N consideradas.

Assim como em 2016, considerando as doses de *Azospirillum* independentemente da quantidade de nitrogênio, a dosagem de 4mL/kg foi a que proporcionou resultados com maiores valores absolutos para todas as variáveis, exceto comprimento de raízes muito finas e comprimento de raízes finas. Houve diferenças significativas para as variáveis comprimento de raízes grossas, diâmetro de raízes e volume total de raízes, sendo que para comprimento total de raízes e área superficial, apesar de não significativa, sugere uma tendência de aumento nos valores das raízes provenientes da inoculação nesta dosagem. (Tabela 9).

A utilização de 8 mL de *Azospirillum* por quilograma das sementes causou também aumento significativo do diâmetro das raízes, da porcentagem das raízes grossas e do volume; no entanto não houve variação estatística significativa para a área superficial total, reduzindo, em contrapartida, a massa da matéria seca das raízes.

Tabela 9. Resultados das avaliações das raízes de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de raízes muito finas (CRMF), comprimento de raízes finas (CRF), comprimento de raízes grossas (CRG), comprimento total de raízes (CRT), diâmetro médio de raízes (DRT), Área superficial de raízes (ART), Volume total de raízes (VRT) e Massa seca de raízes (MR) referentes ao ano agrícola 2017/2018.

Fonte de variação	Doses	CRMF	CRF	CRG	CRT	DRT	ART	VRT	MR
		%	%	%	(cm)	(cm)	(cm ²)	(m ³)	(g)
AZ (mL/kg)	S/Az	66,75a	23,38a	9,75b	1565a	0,59ab	150,23a	11,94ab	3,48a
	2	64,87ab	24,50a	10,5b	1574a	0,40b	139,71a	10,18b	2,44c
	4	61,81ab	24,38a	13,9a	1649a	0,81a	178,26a	15,65a	2,99b
	8	62,38b	24,44a	13,0a	1471a	0,80a	154,4a	13,24ab	2,26c
	80	66,56a	22,75a	10,63b	1836a	0,70a	175,6a	14,15a	3,19a
N (kg/ha)	120	63,31ab	24,81a	11,88ab	1490ab	0,58a	146,9a	11,84a	2,44b
	160	64,19ab	24,18a	11,44ab	1509ab	0,59a	150,6a	12,09a	2,72b
	200	61,75b	24,93a	13,19a	1425b	0,78a	149,4a	12,91a	2,81b
Média Geral		63,95	24,17	11,78	1565	0,6	155,7	12,75	2,79

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em relação à interação entre o *Azospirillum* e as doses de nitrogênio, houve variação estatística significativa para as variáveis diâmetro médio e massa de raízes, sendo que no caso do diâmetro, a inoculação com as doses de 4 e 8mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes proporcionaram resultados superiores nas doses de 80 e 200 kg de nitrogênio por hectare; no caso da massa de matéria seca de raízes, a inoculação mostrou-se favorável nos níveis mais altos de adubação (160 e 200 kg de nitrogênio por hectare) e nestes, a aplicação

de 4mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes apresentou maiores valores e diferentes dos demais tratamentos. (Tabela 10).

Tabela 10. Desdobramentos: doses de *Azospirillum brasiliense* (Az) dentro de doses de nitrogênio (N). Médias dos componentes das avaliações das raízes: comprimentos das raízes muito finas (CRMF, expresso em %), finas (CRF, %) e grossas (CRG, %), diâmetro das raízes (DRT, expresso em cm), área superficial de raízes (ART, expresso em cm²), Volume de raízes (VRT, em m³) e massa de matéria seca de raízes (MR, expresso em gramas) relacionados às plantas de milho doce produzidas no ano agrícola 2017/2018.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	CRMF %	CRF %	CRG %	CRT (cm)	DRT (cm)	ART (cm ²)	VRT (m ³)	MR (g)
80	S/Az	65,25a	25,00a	9,50ab	1675a	1,03a	188,03a	17,18a	5,18a
	2 mL/kg	71,25a	21,25a	7,25b	2302a	0,15b	169,82a	10,48a	2,50b
	4 mL/kg	64,75a	22,50a	13,25a	1628a	0,85a	164,28a	13,73a	2,73b
	8 mL/kg	65,00a	22,25a	12,50a	1740a	0,85a	180,50a	15,25a	2,38b
Médias 80		66,56	22,75	10,63	1836	0,7	175,6	14,15	3,19
120	S/Az	66,75a	22,25a	11,00a	1767a	0,45a	168,8a	13,23a	3,05a
	2 mL/kg	63,25a	25,25a	11,50a	1245a	0,25a	114,78a	8,40a	2,43ab
	4 mL/kg	58,75a	27,25a	14,25a	1487a	0,90a	167,03a	14,93a	2,28b
	8 mL/kg	64,50a	24,50a	10,75a	1462a	0,43a	137,08a	10,83a	2,03b
Médias 120		63,31	24,81	11,88	1490	0,5	146,9	11,84	2,44
160	S/Az	65,50a	24,50a	9,75a	1306a	0,43a	124,43a	9,58a	2,88ab
	2 mL/kg	64,50a	24,50a	11,00a	1428a	0,40a	134,35a	10,08a	2,25b
	4 mL/kg	64,75a	22,75a	12,25a	1883a	0,58a	190,90a	15,48a	3,40a
	8 mL/kg	62,00a	25,00a	12,75a	1421a	0,75a	152,75a	13,23a	2,35b
Médias 160		64,19	24,18	11,44	1509	0,5	150,6	12,09	2,72
200	S/Az	69,5a	21,75a	8,75b	1514a	0,15b	119,68a	7,78b	2,83ab
	2 mL/kg	60,50b	27,00a	12,25ab	1322a	0,68ab	139,88a	11,78ab	2,58b
	4 mL/kg	59,00b	25,00a	15,75a	1599a	0,85a	190,86a	18,48a	3,55a
	8 mL/kg	58,00b	26,00a	16,00a	1263a	1,15a	147,28a	13,65ab	2,28b
Médias 200		61,75	24,93	13,19	1425	0,7	149,4	12,91	2,81

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Segundo Jacoud et al. (1999), os efeitos da inoculação com *Azospirillum* spp. iniciam-se nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta do milho, durante os primeiros dias após a colonização da raiz. As modificações que ocorrem no sistema radicular decorrentes da associação com a bactéria favorecem a absorção da água e dos nutrientes minerais do solo, o que as tornam mais tolerante aos estresses abióticos.

Ainda segundo Hungria et al (2010) a inoculação das sementes de milho e trigo com *Azospirillum brasiliense* (estirpes Abv-5 e Abv-6, as mesmas utilizadas nesta pesquisa) contribuem para o crescimento das raízes totais, o que tem sido observado em pesquisa de campo. Estes dados são similares aos obtidos com os do milho doce, pois a inoculação das sementes beneficiou o desenvolvimento das raízes, proporcionando aumentos significativos do comprimento total de raízes, volume e área superficial, principalmente ao utilizar a dose de 4mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes.

Para milho doce, não há na literatura estudos relacionados à associação da bactéria *Azospirillum* com as raízes, porém Cardozo (2017) avaliou a associação de estirpes de *Azospirillum* em raízes da planta do milho e observou, aos sete dias após a inoculação, que a concentração destas bactérias foi de aproximadamente 10^8 UFC/g de raízes da planta do milho e até o vigésimo primeiro dia $\sim 10^7$ UFC /g de raízes da planta do milho. Concluiu ainda que a associação foi benéfica, visto que a inoculação proporcionou aumento da massa fresca total da raiz e da parte aérea aos 7 e aos 14 dias após a inoculação além da massa da matéria fresca das raízes, primárias e laterais, aos 14 e aos 21 dias, e o aumento do comprimento da parte aérea aos 7 e aos 14 dias, em relação às plântulas controle. Os resultados obtidos para as sementes de milho doce indicaram similaridade, uma vez que a inoculação de 4mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes proporcionou aumento da massa das raízes.

Nesta pesquisa foi observado também que a presença do *Azospirillum* interferiu no desenvolvimento das raízes, sendo que os resultados variaram em função da dose de inoculante e também da adubação empregada (doses de nitrogênio). De forma geral, os tratamentos correspondentes à aplicação de 4mL do *Azospirillum*/kg de sementes foram benéficos, pois os resultados foram positivos para a maior parte das variáveis, para os dois anos de experimento.

3.3. Desenvolvimento da Parte Aérea

Nas plantas produzidas em 2016 (Tabela 11), a inoculação com *Azospirillum* afetou a altura das plantas tanto em V8 como em V12, o diâmetro de colmo em V12 e a massa da matéria seca da parte aérea, avaliada também em V8. A variável nitrogênio teve efeitos significativos em relação ao diâmetro de colmo em V12, o teor de clorofila em ambos os estádios e o teor de nitrogênio foliar. Houve interação entre as doses de *Azospirillum* e de N para as variáveis diâmetro de colmo em V12, teor de clorofila em V8, teor de N e a massa da

matéria seca da parte aérea. Os resultados são apresentados na Tabela 12 e as interações na Tabela 13.

Tabela 11. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea das plantas de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N): Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

Fonte de Variação	GL	ALTV8	ALTV12	DCV8	DCV12	CLV8	CLV12	N	MSPA
Valores dos Quadrados Médios									
<i>Azospirillum</i>	3	0,022*	0,015*	3,653ns	10,102*	537,69ns	277,24ns	0,5401ns	486,0*
Nitrogênio	3	0,008 ns	0,012ns	10,567ns	32,335**	708,18*	1901,67**	34,695**	286,8ns
AZ*N	9	0,004ns	0,005ns	12,486ns	6,527**	387,12*	368,78ns	13,939**	320,6*
Blocos	3	0,004ns	0,004ns	7,156ns	2,498ns	382,20ns	575,77ns	4,4108ns	500,8ns
Kolmogorov		0,074	0,082	0,073	0,059	0,158	0,159	0,096	0,068
F - Levene		1,33	1,38	1,12	1,43	1,15	1,15	1,38	0,91
CV (%)		5,4	4,1	10,6	6,5	19,5	23,8	8,0	19,7

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F.

Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas (F-Levene $p > 0,01$).

A disponibilidade de nitrogênio afeta diversos processos no crescimento e na diferenciação dos tecidos das plantas. Para as variáveis avaliadas no primeiro ano, apesar da maioria não ter diferenças estatísticas significativas, houve incremento nos valores na medida em que a dose de nitrogênio aumentou. Em relação às médias dos tratamentos com *Azospirillum*, de forma geral, a inoculação das sementes de milho doce com essa bactéria favoreceu o aumento nas variáveis analisadas e a aplicação de 4mL/kg foi a que proporcionou os maiores valores.

Tabela 12. Resultados das avaliações dos componentes da parte aérea das plantas de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

Fonte de variação	Doses	ALTV8	ALTV12	DCV8	DCV12	CLV8	CLV12	N	MSPA
		m	m	(mm)	(mm)	Unidades SPAD		(g/kg)	(g/planta)
AZ (mL/kg)	S/Az	1,57b	1,84b	24,1a	25,0b	66,0a	79,1a	25,1a	49,4b
	2	1,62ab	1,90ab	25,3a	26,7a	75,7a	73,2a	25,3a	57,1ab
	4	1,66a	1,91a	24,7a	26,5ab	73,9a	68,9a	25,4a	62,4a
	8	1,61ab	1,88ab	24,9a	26,6a	63,9a	73,6a	25,0a	53,7ab
N (kg/ha)	80	1,60a	1,85a	24,5a	24,7b	71,9ab	68,2a	24,8b	53,0a
	120	1,60a	1,88a	24,3a	25,8b	64,2b	62,3a	23,6b	56,8a
	160	1,62a	1,89a	24,2a	26,1b	64,6b	76,9ab	25,3ab	51,7a
	200	1,65a	1,92a	26,0a	28,11a	78,4a	87,4b	27,1a	61,2a
Média Geral		1,62	1,88	24,8	26,2	69,9	73,69	25,2	55,65

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Ao considerar as interações entre as doses de *Azospirillum* em relação às diferentes doses de N é possível verificar que os efeitos causados pela bactéria foram evidentes nas menores doses de adubação nitrogenada, até 120 kg/ha, para as quais a presença do *Azospirillum* foi benéfica, sendo que na dose de 200 kg/ha do fertilizante as variáveis não apresentaram diferenças significativas entre as plantas originadas das sementes inoculadas e não inoculadas (Tabela 13).

Com exceção do teor de clorofila em V12, para as demais variáveis dentro da menor dose de N a presença do *Azospirillum* foi benéfica, principalmente para 4 mL/kg. Mesmo quando as diferenças não foram significativas, a aplicação do inoculante gerou as maiores médias. A massa da matéria seca da parte aérea para 80 kg/ha de N, por exemplo, foi 36% superior nas plantas originadas das sementes inoculadas com 4mL/kg de *Azospirillum* quando comparada ao Controle, dentro da mesma faixa de adubação (64,2 g/planta comparado a 47,3 g/planta).

De acordo com Cantarella et al. (1996) o teor ideal de nitrogênio da folha para o desenvolvimento da planta do milho é 27 g a 35 g de N por quilograma de matéria seca. Mesmo na dosagem mais baixa de 80kg/ha, a presença do *Azospirillum* beneficiou as plantas e houve aumento do aproveitamento deste nutriente, visto que a aplicação de 8mL/kg de *Azospirillum* proporcionou acúmulo de 27,1 g/kg de N na matéria seca, superior ao

acumulado pelas plantas, originadas das sementes não inoculadas e nas demais doses de 2 e 4 mL de *Azospirillum* por quilograma de semente.

Tabela 13. Desdobramentos dos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila (CLV8 e CLV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	ALTV8 m	ALTV12 m	DCV8 mm	DCV12 (mm)	CLV8 SPAD	CLV12 SPAD	N (g/kg)	MSPA (g)
80	S/Az	1,5a	1,78a	22,0a	23,1b	61,6a	87,6a	23,9ab	47,3a
	2 mL/kg	1,6a	1,92a	25,5a	24,9ab	80,2a	65,1ab	22,3b	52,9a
	4 mL/kg	1,6a	1,88a	26,3a	27,0a	80,4a	52,8b	25,9ab	64,2a
	8 mL/kg	1,5a	1,83a	24,3a	23,8b	65,6a	67,3ab	27,1a	47,7a
Médias 80		1,60	1,85	24,5	24,7	71,9	68,2	24,8	53,0
120	S/Az	1,5a	1,85a	23,4a	23,4b	68,3a	65,8a	24,9ab	41,3b
	2 mL/kg	1,6a	1,91a	22,8a	26,0ab	53,6a	61,2a	25,9a	65,6a
	4 mL/kg	1,6a	1,89a	24,9a	26,4ab	76,3a	57,3a	22,4ab	56,0ab
	8 mL/kg	1,6a	1,85a	26,3a	27,5a	60,4a	65,0a	21,2b	64,2a
Médias 120		1,60	1,88	24,3	25,8	64,2	62,3	23,6	56,8
160	S/Az	1,6a	1,86a	25,2a	25,9a	57,3a	83,7a	25,0a	41,2b
	2 mL/kg	1,6a	1,84a	25,6a	27,1a	73,2a	75,7a	25,1a	46,4ab
	4 mL/kg	1,7a	1,93a	23,7a	25,5a	61,0a	82,2a	25,2a	66,1a
	8 mL/kg	1,6a	1,91a	22,2a	25,9a	66,8a	65,8a	26,0a	53,1ab
Médias 160		1,62	1,89	24,2	26,1	64,6	76,9	25,3	51,7
200	S/Az	1,6a	1,88a	25,9a	27,6a	76,9ab	79,3a	26,9a	67,7a
	2 mL/kg	1,6a	1,91a	27,1a	28,6a	96,0a	90,6a	27,8a	63,6a
	4 mL/kg	1,7a	1,96a	23,9a	27,1a	77,8ab	83,4a	28,2a	63,3a
	8 mL/kg	1,7a	1,91a	26,9a	29,3a	62,9b	96,2a	25,7a	49,9a
Médias 200		1,65	1,92	26,0	28,1	78,4	87,4	27,1	61,2

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Nas demais doses de N, como a de 120kg/ha a inoculação com *Azospirillum* continuou a favorecer o desenvolvimento das plantas, mesmo não sendo tão evidente quanto o resultado da dose de 80 kg/ha de fertilizante. Em relação à massa da matéria seca da parte aérea, a presença de *Azospirillum* proporcionou incrementos positivos quando associada ao nitrogênio, até a dose de 160kg ha⁻¹. Para a dose de 200 kg/ha de N não foram observados efeitos da interação com *Azospirillum*.

O teor de clorofila, indicado pelo índice SPAD, fornece indícios do aproveitamento de nitrogênio pelas plantas de milho. Os valores obtidos são proporcionais ao teor de clorofila presente na folha. É importante analisar o teor de clorofila, visto que autores como Hurtado et al. (2009) e Rambo et al. (2011) relataram haver correlação positiva entre teor de clorofila das folhas e doses de nitrogênio aplicadas na cultura além de também estar relacionado aos aumentos da produtividade de grãos de milho.

Não há na literatura parâmetros estabelecidos para milho doce. Para o milho grão, segundo Argenta et al. (2004), os valores SPAD de 45,4; 52,1; 55,3 e 58, obtidos nos estádios de V4, V7, V10 e reprodutivo, respectivamente, estariam relacionados à disponibilidade ideal de nitrogênio para a planta; portanto, valores inferiores nos referidos estádios fenológicos, indicariam deficiência de nitrogênio.

Para teor de clorofila no estágio V8, a aplicação de 4mL/kg de *Azospirillum* seguiu padrão superior aos tratamentos não inoculados, para todas as quantidades de nitrogênio utilizadas. As demais dosagens de *Azospirillum* variaram em função da quantidade de N, não apresentando um padrão de crescimento ou redução constante.

O diâmetro de colmo em V12, indica que para as menores quantidades de nitrogênio os resultados das plantas originadas das sementes inoculadas foram superiores, enquanto que a partir dos 160 kg/ha de nitrogênio as diferenças entre plantas oriundas de sementes inoculadas e não inoculadas tornaram-se menos evidentes.

No segundo ano (2017) a inoculação com *Azospirillum* proporcionou diferenças significativas para diâmetro de colmo em V8, teor de clorofila em V8 e V12 além da massa seca da parte aérea, independente da dose de nitrogênio considerada. A adubação nitrogenada, por sua vez, influenciou significativamente a maior parte das variáveis, com exceção do diâmetro de colmo em V12, conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura : Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

Fonte	de	ALTV8	ALTV12	DCV8	DCV12	CLV8	CLV12	N	MSPA
Varição	GL	Valores dos Quadrados Médios							
<i>Azospirillum</i>	3	0,007ns	0,005ns	19,029*	7,471ns	6,085 *	5,211**	1,08 ns	1009,5**
Nitrogênio	3	0,163**	0,0768**	28,000**	12,440ns	261,8**	436,16**	182,48**	1025,1**
AZ*N	9	0,004ns	0,002ns	15,560**	11,152ns	4,87**	1,38*	0,51ns	115,5**
Blocos	3	0,004ns	0,002ns	6,8268ns	2,281ns	1,35ns	0,486ns	4,12ns	44,97ns
Kolmogorov		0,128	0,133	0,170	0,166	0,230	0,157	0,114	0,127
F - Levene		1,45	3,24	2,62	3,01	1,63	0,62	1,33	1,69
CV (%)		4,00	2,60	9,10	9,20	2,50	2,05	5,60	5,50

** e * significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ns não significativo pelo teste F. Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a (F-Levene $p > 0,01$).

Plantas originadas de sementes inoculadas com *Azospirillum* tiveram aumento significativo do diâmetro do colmo em V8 e teor relativo de clorofila em V12 independentemente da quantidade de nitrogênio considerada, ao contrário do que ocorreu para massa da matéria seca da parte aérea, em que todos os tratamentos inoculados apresentaram menor massa da matéria seca em relação às plantas originadas das sementes controle. O aumento da quantidade de nitrogênio, independentemente de as plantas serem originadas das sementes inoculadas ou não, gerou incrementos nas variáveis analisadas (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

Fonte de variação	Doses do produto	ALTV8	ALTV12	DCV8	DCV12	CLV8	CLV12	N	MSPA
		m	m	mm	mm	Unidades SPAD		(g/kg)	(g/planta)
AZ (mL/kg)	S/Az	1,5a	2,0a	25,1ab	26,7a	48,9ab	51,3b	29,7a	89,2a
	2	1,5a	1,9a	23,3b	26,3a	49,7a	52,6a	30,2a	81,5b
	4	1,5a	1,9a	25,4ab	26,0a	48,2b	51,6b	29,9a	81,1b
	8	1,5a	2,0a	25,7a	27,6a	49,1ab	51,4b	29,7a	69,9c
N (kg/ha)	80	1,4c	1,9c	23,8b	26,1a	45,3c	46,3d	26,5d	74,1c
	120	1,4c	1,9c	23,9b	25,8a	47,9b	48,8c	28,1c	76,9bc
	160	1,5b	2,0b	25,0ab	27,8a	48,1b	53,7b	30,8b	78,6b
	200	1,6a	2,1a	26,7a	27,0a	54,7a	58,1a	34,2a	92,1a
Média Geral		1,49	1,99	24,9	26,7	48,9	51,7	29,9	80,43

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os resultados relacionados às doses de *Azospirillum* em função da quantidade do adubo nitrogenado (Tabela 16), mostram que na avaliação da altura das plantas (V8 e V12), os aumentos observados foram devidos às variações das quantidades de nitrogênio e sem a interferência do *Azospirillum*. Para diâmetro de colmo em V8, os tratamentos correspondentes às sementes inoculadas foram, de forma geral, estatisticamente iguais ou inferiores aos não inoculados, com exceção daqueles expostos ao nível 160 kg/ha N de adubação, para o qual as doses de 4mL/kg e 8mL/kg de inoculante foram superiores às demais. Não houve relação entre aumento das doses de *Azospirillum* e aumento ou diminuição dos diâmetros do caule e no estágio V12 as plantas oriundas de sementes inoculadas não mostraram diferenças significativas.

Em relação ao teor de nitrogênio foliar não houve diferenças significativas entre plantas originadas de sementes inoculadas e Controle, mas a dosagem de 2 mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes mostrou resultados superiores em números absolutos destacando-se na dosagem mais baixa de fertilizante (80 kg/ha de N) em que os resultados demonstram que mesmo em níveis baixos de fertilizante, a inoculação favoreceu o aproveitamento de nitrogênio, evidenciado pelo valor de 27,4 g de N por kg de MS, de acordo com a quantidade de nitrogênio sugerida por Cantarella et al. (1996).

Tabela 16. Desdobramentos dos resultados das avaliações dos componentes da parte aérea de milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N): Altura de plantas nos estádios fenológicos V8 e V12 (ALTV8 e ALTV12, respectivamente); Diâmetro de Colmo nos estádios de V8 e V12 (DCV8 e DCV12, respectivamente); Teor de Clorofila nos mesmos estádios citados (DCV8 e DCV12), teor de nitrogênio (N) e Massa matéria seca da parte aérea (MSPA). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	ALTV8	ALTV12	DCV8	DCV12	CLV8	CLV12	N	MSPA
		m	m	mm	(mm)	Unidades SPAD		(g/kg)	(g/planta)
80	S/Az	1,3b	1,9a	23,9a	26,9a	45,1a	45,9a	25,9a	91,1a
	2 mL/kg	1,4ab	1,9a	23,7a	26,2a	45,7a	46,5a	27,4a	72,4b
	4 mL/kg	1,4ab	1,9a	23,9a	25,6a	45,0a	46,7a	26,7a	69,9bc
	8 mL/kg	1,5a	2,0a	23,7a	25,8a	45,3a	46,3a	25,9a	63,0c
Médias 80		1,4	1,9	23,8	26,1	45,3	46,3	26,5	74,1
120	S/Az	1,4a	1,9a	28,5a	28,5a	47,8a	48,2b	28,0a	88,1a
	2 mL/kg	1,5a	2,0a	21,4b	23,9a	47,2a	49,9a	28,5a	77,5b
	4 mL/kg	1,5a	2,0a	25,7a	25,6a	48,1a	48,6ab	27,8a	77,2b
	8 mL/kg	1,5a	2,0a	24,4ab	25,2a	48,5a	48,3b	28,1a	64,7a
Médias 120		1,4	1,9	23,9	25,8	47,9	48,8	28,1	76,9
160	S/Az	1,5a	2,0a	23,9b	25,9a	47,6a	53,4ab	30,9a	81,2a
	2 mL/kg	1,5a	2,0a	25,3ab	28,0a	48,9a	54,5a	31,0a	79,2a
	4 mL/kg	1,6a	2,0a	28,5a	27,4a	47,7a	54,1ab	30,9a	79,7a
	8 mL/kg	1,5a	2,0a	29,1a	29,8a	47,9a	52,9b	30,3a	74,5a
Médias 160		1,5	2,0	25,0	27,8	48,1	53,7	30,8	78,6
200	S/Az	1,6a	2,1a	24,3a	25,6a	55,3ab	57,8b	34,1a	96,5a
	2 mL/kg	1,6a	2,1ab	22,6a	27,1a	57,1a	59,3a	34,2a	96,7a
	4 mL/kg	1,6a	2,0b	23,4a	25,5a	52,0c	56,9b	34,1a	97,7a
	8 mL/kg	1,7a	2,1ab	25,6a	29,6a	54,5b	58,3ab	34,4a	77,5b
Médias 200		1,6	2,1	26,7	27,0	54,7	58,1	34,2	92,1

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os valores da clorofila, em ambos os estádios fenológicos avaliados (V8 e V12), aumentaram na medida em que aumentou a dose de N e entre os tratamentos (controle e inoculados) as plantas originadas da inoculação de 2mL/kg na semente foram superiores ao Controle e às demais doses de *Azospirillum*, em todos os níveis de adubação avaliados; para o diâmetro de colmo em V8 as plantas provenientes de sementes inoculadas apresentaram maiores valores apenas quando combinadas a doses de 160 kg N ha⁻¹ e no caso de massa de matéria seca da parte aérea, os tratamentos oriundos de sementes inoculadas foram inferiores quando comparados aos obtidos das plantas originadas das sementes Controle.

Diversas contribuições foram relatadas como resultado da interação das plantas com as bactérias do gênero *Azospirillum*. Dentre as vantagens conferidas às plantas destacam-se o aumento dos níveis da clorofila e do nitrogênio, da altura da planta, da produção de biomassa, da produção de grãos, do desenvolvimento das raízes, da tolerância ao estresse hídrico, entre outras (HUNGRIA et al. 2010; LANA et al. 2012). Dessa forma, esses microrganismos proporcionam incrementos para o desenvolvimento e a produtividade das plantas (HUNGRIA et al. 2010).

Na pesquisa atual houve diferenças nos resultados de acordo com o ano considerado. A inoculação das sementes de milho doce resultou em diferenças significativas no diâmetro de colmo, havendo incremento nestes valores e alterações no teor de clorofila, em que a inoculação também foi favorável, principalmente na dose de 4mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes. Outras variáveis como altura de plantas foram representadas por diferenças significativas apenas em 2016, e neste caso a inoculação nas sementes também gerou plantas maiores, até a dose de 4mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes.

Cunha et al. (2014) avaliou os efeitos da inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* e, no entanto, não obteve diferenças nos parâmetros avaliados, como o diâmetro do colmo, a altura de inserção da espiga, a altura de planta e o índice de área foliar.

Marini et al. (2015) avaliaram os efeitos da inoculação de *Azospirillum* em dois híbridos simples de milho e observaram que a inoculação gerou incremento de 11% no valor da massa da matéria seca, independentemente da quantidade aplicada do nitrogênio. Para o milho doce, na pesquisa atual, observou-se o incremento da massa de matéria seca de plantas no ano 2016, sendo que em 2017 ocorreu o contrário, e a inoculação das sementes gerou plantas com menor massa de matéria seca, independente da dose de inoculante empregada. As diferenças entre as áreas utilizadas nos dois anos de experimento, bem como a variação das condições climáticas poderiam justificar as diferenças observadas de um ano para outro.

Sangoi et al. (2015) não verificaram influência da inoculação do *Azospirillum* sp. na semente no índice de clorofila foliar da planta do milho, o que pode ser explicado pelo fato de que quando a planta absorve quantidade excessiva de nitrogênio, que acumula-se na forma de nitrato, o nitrogênio não associa-se à molécula de clorofila, e não é detectado pelo medidor de clorofila (RAMBO et al. 2007). Para o ano de 2016 da pesquisa atual, situação semelhante foi observada, visto que não houve diferenças significativas para teor de clorofila entre plantas originadas de inoculação e controle, sendo que para o ano de 2017 foi possível detectar diferenças e a dose de 2mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes

proporcionou resultados maiores para estas variáveis, em ambos os estádios fenológicos avaliados (V8 e V12).

Um fato a ser considerado é que resultados deste tipo de interação são afetados por fatores ambientais como os relacionados ao solo, às diferenças de afinidade entre os genótipos das plantas e das bactérias (COMPANT, et al. 2010). Portanto, é importante o desenvolvimento de pesquisas com diferentes tipos de solos, cultivares e cepas bacterianas (MUS, 2016).

3.4. Avaliação qualitativa-frutos

Os principais componentes de produção do milho doce são: número de grãos por fileira e número de fileiras de grãos assim como o comprimento e diâmetro de espigas, importante principalmente para processamento industrial, no caso do milho doce. Variações nestes componentes refletem diretamente na produtividade, sendo que o aumento das variáveis favorece também incrementos na produção por hectare (FORNASIERI, 2007).

Para aumentar o rendimento industrial é necessário, portanto, que as espigas sejam grandes, cilíndricas e com determinado número de grãos e de fileiras; valores maiores favorecem o rendimento industrial (BARBIERI, 2008). Outro aspecto importante é que as avaliações foram realizadas logo após a colheita, visto que a vida útil do milho doce é muito curta após a colheita, e dessa forma as espigas foram avaliadas imediatamente na data de colheita.

A massa das espigas também influencia em variações no rendimento. Cada espiga de milho é composta de 65,32 a 74,57% de grãos, sendo o restante caracterizado pelo sabugo, conforme publicado em pesquisas conduzidas por Andrade et. al. (1996). A proporção entre sabugo e grãos poderá variar de acordo com o genótipo considerado, porém considera-se que este intervalo represente a maior parte das variedades comerciais atualmente. Este índice pode ser utilizado para inferir sobre a produtividade do milho, através da relação com a massa de espigas e número de grãos por espiga, determinados logo após a colheita.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os valores dos quadrados médios da análise de variância para os resultados das plantas avaliadas em 2016 e 2017, respectivamente. A inoculação das sementes de milho doce com *Azospirillum* influenciou apenas o número de fileiras de grãos para o primeiro ano, havendo interação da bactéria com a adubação nitrogenada para as variáveis comprimento e diâmetro de espigas; as variações das quantidades do nitrogênio influenciaram todas as variáveis estudadas, com exceção da

quantidade de água dos grãos que não foi afetada por nenhum dos tratamentos aplicados. A massa de espigas não foi avaliada em 2016 devido a problemas em campo na ocasião da colheita que poderiam interferir na avaliação dos resultados, e sendo assim, foram considerados apenas os dados avaliados em 2017.

Para as plantas provenientes de sementes inoculadas em 2017 (Tabela 18), houve diferenças significativas no comprimento das espigas e número de fileiras de grãos, sendo que houve interação com a adubação nitrogenada em relação ao comprimento das espigas e ao número dos grãos. O nitrogênio afetou todas as variáveis estudadas, com exceção do número de fileiras, umidade de grãos e massa de espigas.

Tabela 17. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações na colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

Fonte de Variação	de GL	CE	DE	NF	NG	UG
<i>Azospirillum</i>	3	3,96ns	0,06ns	1,81**	1,45 ns	2,02ns
Nitrogênio	3	70,59**	0,33**	6,55**	8,01**	1,89ns
AZ*N	9	6,04**	0,18**	0,17 ns	0,61 ns	4,08ns
Blocos	3	0,14 ns	0,08 ns	0,23 ns	0,74**	14,97ns
Kolmogorov		0,14	0,07	0,12	0,12	0,14
F - Levene		1,1	0,9	1,6	0,8	1,7
CV (%)		5,0	3,2	2,60	2,65	5,8

Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a (F-Levene $p>0,01$).

Tabela 18. Quadro da Análise de Variância referente aos resultados das avaliações na colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

Fonte de Variação	GL	CE	DE	NF	NG	UG	ME	PROD
<i>Azospirillum</i>	3	3,06**	0,04ns	0,56*	0,28ns	2,86ns	378,07ns	1,46 ns
Nitrogênio	3	2,81**	0,09*	0,03ns	61,32**	1,16ns	95,69ns	17,41*
AZ*N	9	1,29**	0,03ns	0,18ns	0,82**	4,55ns	352,64ns	3,16 ns
Blocos	3	1,28ns	0,03ns	0,38ns	0,19ns	15,76ns	507,74ns	2,84 ns
Kolmogorov		0,06	0,07	0,12	0,09	0,10	0,13	0,15
F - Levene		1,6	1,5	1,8	1,5	0,9	1,9	1,3
CV (%)		3,50	3,61	3,12	1,14	3,48	12,50	14,7

Valores em negrito de Kolmogorov indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a (F-Levene $p>0,01$).

Para os resultados em 2016 (Tabela 19), as plantas cujas sementes foram inoculadas com doses de 4 e 8 mL/kg apresentaram acréscimo no número de fileiras, independentemente da quantidade de nitrogênio utilizada, diferindo estatisticamente dos resultados relativos a 2mL/kg e aos do Controle. O número de grãos por fileira, apesar de não apresentar diferenças significativas entre os tratamentos, em números absolutos aumentou para as doses de 4 e 8 mL de *Azospirillum*/kg; o comprimento e diâmetro de espigas aumentaram, sendo os valores máximos obtidos com a dose de 4mL/kg, mas não foram diferentes estatisticamente.

Tabela 19. Resultados das avaliações dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

Fonte de variação	Doses	CE	DE	NF	NG	UG
		cm	cm			(%)
AZ (mL/kg)	S/Az	26,3a	5,4a	14,2b	38,3a	70,9a
	2	25,9a	5,5a	14,4b	38,3a	71,1a
	4	26,4a	5,5a	14,8a	38,8a	70,8a
	8	25,3a	5,4a	14,9a	38,9a	71,6a
N (kg/ha)	80	22,8b	5,2c	14,0c	37,7c	71,1a
	120	26,6a	5,5ab	14,1c	38,3bc	71,2a
	160	27,1a	5,4b	14,9b	39,0ab	71,5a
	200	27,4a	5,6a	15,3a	39,3a	70,9a
Média Geral		26,0	5,4	14,6	38,6	71,1

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os resultados obtidos em 2017, tanto o comprimento das espigas como o número de fileiras de grãos foram maiores para a dose de 8 mL/kg de *Azospirillum*, independentemente da quantidade utilizada do nitrogênio. As outras variáveis não diferiram estatisticamente, porém, por exemplo no caso da massa das espigas, os valores aumentaram na medida em que houve o aumento da quantidade inoculada do *Azospirillum*. Não houve diferenças significativas para a estimativa de rendimento, entre as plantas originadas de sementes inoculadas e controle. Incrementos na adubação nitrogenada também aumentaram os valores das variáveis comprimento e diâmetro das espigas, número de grãos e rendimento, como pode ser visto na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados das avaliações dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

Fonte de variação	Doses	CE	DE	NF	NG	UG	ME	PROD
		cm	cm			%	g	(ton/ha)
AZ (mL/kg)	S/Az	18,3b	4,8a	14,2ab	37,2a	70,3a	215,7a	17,22a
	2	18,1b	4,7a	14,0b	37,5a	71,1a	222,4a	17,92a
	4	17,9b	4,7a	14,2ab	37,3a	70,9a	223,7a	17,69a
	8	18,9a	4,7a	14,4a	37,4a	71,3a	227,4a	17,77a
N (kg/ha)	80	17,9b	4,6b	14,3a	34,6d	70,7a	225,1a	16,78b
	120	18,2b	4,7ab	14,2a	37,3c	71,0a	219,5a	17,29ab
	160	18,2b	4,7ab	14,2a	38,2ba	71,2a	223,4a	17,39ab
	200	18,9a	4,8a	14,2a	39,2a	70,7a	221,4a	19,17a
Média Geral		18,3	4,8	14,2	37,3	70,9	222,3	17,64

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Analisando os desdobramentos, para os resultados de 2016, para a variável comprimento de espigas, a qual houve interação de Az x N, foi possível observar que para o comprimento a inoculação foi favorável apenas quando foram utilizados 80 kg de nitrogênio por hectare, enquanto que para quantidades superiores, a inoculação das sementes causou redução do comprimento da espigas; para a colocação de mais de 80 kg de nitrogênio por hectare, os resultados relacionados ao controle foi superior aos obtidos com a inoculação, como está demonstrado na Tabela 21.

Nas doses de nitrogênio, caracterizadas por 80 e 120 kg/ha, as plantas originadas de sementes inoculadas demonstraram aumento no diâmetro de espigas, destacando-se a dose de 4 mL de *Azospirillum* por quilograma de sementes; na adubação de 160 kg de nitrogênio por hectare, a dose de 2mL/kg de *Azospirillum* foi a que proporcionou espigas com maior diâmetro, e no nível mais alto de nitrogênio (200 kg/ha), as doses de 2 e 8 mL de inoculante por quilograma de sementes foi a que resultou em espigas com maior diâmetro. Não houve, portanto, a relação direta entre o aumento da dose de inoculante e aumentos ou diminuições do valor da variável considerada (Tabela 21).

Tabela 21. Desdobramentos dos resultados dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG). Dados referentes ao ano agrícola 2016/2017.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	CE	DE	NF	NG	UG
		cm	cm			%
80	S/Az	20,9b	4,9b	13,5b	37,2a	70,2a
	2 mL/kg	23,2ab	5,2b	13,6b	38,1a	71,9a
	4 mL/kg	23,6a	5,6a	14,5a	38,1a	71,5a
	8 mL/kg	23,8a	5,2b	14,4a	37,5a	70,8a
Médias 80		22,8	5,2	14,0	37,7	71,1
120	S/Az	27,9a	5,5ab	13,8b	38,1a	69,7a
	2 mL/kg	26,8b	5,4ab	13,7b	37,8a	71,9a
	4 mL/kg	26,4ab	5,6a	14,5a	38,3a	70,7a
	8 mL/kg	25,2ab	5,3b	14,4ab	38,9a	72,3a
Médias 120		26,6	5,5	14,1	38,3	71,2
160	S/Az	28,4a	5,4b	14,6a	39,1a	72,4a
	2 mL/kg	27,1ab	5,7a	15,0a	38,4a	71,2a
	4 mL/kg	27,3b	5,2c	15,2a	39,2a	70,9a
	8 mL/kg	25,3ab	5,3bc	14,9a	39,2a	71,6a
Médias 160		27,1	5,4	14,9	39,0	71,5
200	S/Az	28,0a	5,4b	15,0a	38,8a	71,3a
	2 mL/kg	26,4a	5,7ab	15,2a	39,1a	69,5a
	4 mL/kg	28,3a	5,5b	15,4a	39,5a	70,2a
	8 mL/kg	26,9a	5,8a	15,6a	39,9a	71,7a
Médias 200		27,4	5,6	15,3	39,3	70,9

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em 2017, houve interação entre o *Azospirillum* e o nitrogênio para as variáveis comprimento de espigas e número de grãos. De acordo com os desdobramentos, Tabela 22, em relação ao comprimento da espiga, a dose favorável de *Azospirillum* foi a de 8mL/kg, evidenciada para as utilizações de 160 kg de nitrogênio/ha. Nos demais níveis de adubação nitrogenada, não houve diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados. Para as demais variáveis, os resultados das plantas originadas de sementes inoculadas foram estatisticamente iguais aos do controle, em todos os níveis de adubação avaliados.

Tabela 22. Desdobramentos dos resultados dos componentes da colheita do milho doce em função da aplicação do *Azospirillum brasiliense* (Az) e Nitrogênio (N) em cobertura: Comprimento de espiga (CE), Diâmetro de espiga (DE), Número de fileiras de grãos (NF), Número de grãos por fileira (NG), Umidade de grãos (UG) e Massa de Espigas sem palha (ME) e estimativa de produtividade (PROD). Dados referentes ao ano agrícola 2017/2018.

DOSE N (kg/ha)	Dose AZ	CE	DE	NF	NG	UG	ME	PROD
		cm	cm			%	g	(ton/ha)
80	S/Az	18,1a	4,8a	14,4a	34,5a	68,7a	211,9a	16,37a
	2 mL/kg	18,3a	4,6a	13,8a	34,3a	71,5a	226,0a	17,29a
	4 mL/kg	17,4a	4,6a	14,5a	34,9a	71,8a	235,2a	17,71a
	8 mL/kg	18,1a	4,6a	14,4a	34,8a	70,6a	227,2a	15,73a
Médias 80		17,9	4,6	14,3	34,6	70,7	225,1	16,78
120	S/Az	18,7a	4,8a	14,0a	37,1a	69,4a	217,5a	17,03a
	2 mL/kg	18,3ab	4,7a	13,9a	37,1a	72,0a	212,8a	16,89a
	4 mL/kg	17,5b	4,8a	14,4a	37,7a	70,9a	208,7a	17,25a
	8 mL/kg	18,5ab	4,9a	16,7a	37,5a	71,6a	239,2a	17,99a
Médias 120		18,2	4,8	14,2	37,3	71,0	219,5	17,29
160	S/Az	18,1b	4,7a	14,2a	38,1ab	71,9a	218,2a	17,58a
	2 mL/kg	17,2b	4,7a	14,3a	38,8a	70,9a	222,7a	17,39a
	4 mL/kg	18,0b	4,7a	14,3a	38,1ab	70,8a	223,3a	16,20a
	8 mL/kg	19,5a	4,7a	14,2a	37,9b	71,4a	229,5a	18,34a
Médias 160		18,2	4,7	14,2	38,2	71,2	223,4	17,38
200	S/Az	18,3b	5,0a	14,2a	39,0ab	71,2a	215,3a	17,89a
	2 mL/kg	18,8ab	4,8ab	14,0a	39,7a	69,9a	228,0a	20,11a
	4 mL/kg	18,9ab	4,8ab	14,1a	38,4b	70,2a	227,6a	19,61a
	8 mL/kg	19,7a	4,6b	14,4a	39,5a	71,6a	213,7a	19,03a
Médias 200		18,9	4,8	14,2	39,2	70,7	221,4	19,16

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Na literatura não há informação sobre a influência do *Azospirillum* para a planta do milho doce, porém Cavallet (2000) aplicou *Azospirillum* spp. planta ou semente do milho e afirmou que a inoculação aumentou o comprimento das espigas em 6% (de 13,6 cm para 14,4 cm) além de contribuir positivamente para a produtividade.

Repke et al. (2013) avaliaram a inoculação de *Azospirillum brasiliense* em sementes de milho e verificaram que a inoculação associada a aplicação em cobertura com o nitrogênio, não interferiu no desenvolvimento das plantas e nem na produtividade e também não afetaram o comprimento e nem o diâmetro das espigas.

Concluíram, ainda, que o uso de *Azospirillum* não substitui o uso dos fertilizantes nitrogenados e tampouco permite a redução quantidade a ser aplicada, uma vez que as

diferenças observadas foram devidas à variação nas quantidades de nitrogênio e não as do *Azospirillum*.

Estes dados corroboram com a pesquisa atual, visto que a inoculação de sementes de milho doce com *Azospirillum* influenciou variáveis como comprimento de espigas, além de número de fileiras de grãos, dependendo do ano agrícola considerado, porém, não resultou em diferenças significativas em relação à estimativa do rendimento. Dessa forma, não é possível considerar que a inoculação supre a adubação com nitrogênio, para as plantas do milho doce.

Outros autores como Gitti et al. (2013) ao avaliar os efeitos de inoculação de *Azospirillum* em sementes de milho, associado à adubação nitrogenada em cobertura, verificou que não houve influência do *Azospirillum* no comprimento de espigas, houve apenas diferenças devido às variações da quantidade de nitrogênio.

Ramos et al. (2017) avaliaram a interação de *Azospirillum* e nitrogênio em cobertura e concluíram que o uso do inoculante não afetou as variáveis comprimento e diâmetro de espigas, tampouco número de fileiras de grãos; sendo que as variações obtidas foram devidas ao nitrogênio. Oliveira et al. (2017) ao analisarem a influência de *Azospirillum brasiliense* (estirpes Abv-5 e Abv-6) aplicado na semente de milho na dose de 4 mL/kg não verificaram diferenças significativas em relação ao comprimento e ao diâmetro das espigas, bem como para o número de fileiras e de grãos por fileira; observaram apenas que houve interação entre o *Azospirillum* e a adubação nitrogenada para o número de grãos, em que a inoculação foi favorável, gerando incrementos para as quatro doses de N consideradas, em comparação ao que não foi inoculado.

Nos dois anos desta pesquisa foi possível verificar que a inoculação

o com *Azospirillum* não influenciou diretamente o aumento da produtividade. Os resultados indicaram que houve acréscimo nos valores de variáveis como comprimento de espigas e número de fileiras de grãos com o uso do inoculante, porém não foram identificadas alterações significativas para a produtividade.

4. CONCLUSÕES

A inoculação do *Azospirillum brasiliense* nas sementes de milho doce, híbrido BC2158 F1, interfere positivamente no desenvolvimento das plantas de milho doce. Contribuiu de forma positiva no desenvolvimento das raízes, alterando, principalmente, o comprimento, o diâmetro e a massa da matéria seca; na parte aérea tem efeitos na variação do teor de clorofila, no diâmetro do colmo e no teor de nitrogênio foliar, afetando também o número de fileiras de grãos e comprimento da espiga. Apesar da interação com adubação nitrogenada, para as variáveis comprimento de raiz total, diâmetro de raízes, massa seca de parte aérea, diâmetro de colmo nos estádios V8 e V12 e teor de clorofila em V8, não resultou em aumentos significativos da produtividade das plantas de milho doce, independente da dose de inoculante empregada. A inoculação com *Azospirillum brasiliense* não prejudicou a qualidade das sementes, até os 60 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de sementes e mudas. Levantamento de dados socioeconômicos do agronegócio de hortaliças (Ano Base 2014) – Disponível em: http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%202029MAIO2014.pdf Acesso em: 15/10/2018.
- ANDREOLI, C.; KHAN, A. A. Improving papaya seedling emergence by matricconditioning and gibberellin treatment. **Hortscience**, v. 28, p. 708-709, 1993.
- ANDREOLI, C.; KHAN, A. A. Matricconditioning integrated with gibberellic acid to hasten seed germination and improve stand establishment of pepper and tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1953-1958, 1999.
- ANDRADE, J. B., JUNIOR, E. F., HENRIQUE, W., & NOGUEIRA, J. R. Porcentagem de grão, palha e sabugo na espiga de 20 cultivares de milho. *Boletim de Indústria Animal*, v. 53, p. 87-90, 1996.
- ARAGÃO, C. A. **Avaliação de híbridos simples braquíticos de milho super doce (*Zea mays* L.) portadores do gene *shrunken-2* (*sh2sh2*) utilizando o esquema dialélico parcial**. 2002. 101 P. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E. ; CATANEO, A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.25, p. 43-48, 2003.
- ARAUJO, E. F.; SILVA, R. F.; CORRÊA, P. C. Efeitos imediatos e latentes da temperatura e da umidade relativa do ar de secagem na qualidade fisiológica de sementes de milho-doce, cultivar BR 400. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, p.21-30, 2000.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; SANGOI, L. Leaf relative chlorophyll content as an indicator parameter to predict nitrogen fertilization in maize. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1379-1387, 2004.
- BALDANI, J.; CARUSO, L. BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, V. 29, p.911 – 922, 1997.
- BALDANI, J.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp *Soil Biology and Biochemistry*. v, 12, 4,P. 433-439, 1980.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. D.L.; , SELDIN, L. , DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 627-639, jun. 1997.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1265-1276, jul. 1999.

- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.
- BARBIERI, V. H. **Melhoramento genético do milho doce.** 2008. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/VHBBarbieri-200801-Resumo.pdf>. Acesso em: 25 out. 2016.
- BARILLI, D. R.; TSUTSUMI, C. Y.; MAY, A.; MIRANDA, A. M.; HACHMANN, T. L.; MODOLON, T. A. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos antes da semeadura. **Cadernos de Agroecologia**, Fortaleza, v. 6, n. 2, p.1-5, 2011.
- BASHAN, Y.; BASHAN, G. H. L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8. p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y.; BUSTLLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J. P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in weath seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biol Fertil Soils**, v. 42, p. 279-285, 2006.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Can. J. Microbiology Research**. V. 43. p.103-121, 1997.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas:** noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.
- BOHM, W. Methods of studing root systems. New York: Springer verlag, 1979. 190 p.
- BORDALLO, P.N.; PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GABRIEL, A.P.C. Análise dialélica de genótipos de milho doce e comum para caracteres agrônômicos e proteína total. **Horticultura brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.123-127, 2005.
- BOTTINI, R., FULCHIERI, M., PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, v. 90, n. 1, p. 45-47, 1989.
- BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p.58-64, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: Mapa/ACS. 2009, 365p.
- BREWBAKER, J. L. Hawaiian Supersweet #9 corn. **HortScience**, Alexandria, v.10, p. 427, 1977.
- BREWBAKER, J. L.; BANAFUNZI, N. Hawaiian Supersweet #6 corn. **HortScience**, Alexandria, v.10, p. 427, 1975.
- CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. O. ; FURLANI, A. M. C., eds. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico & Fundação, 1996. p.43-71. (Boletim técnico, 100).
- CARDOZO, A. M.; Inoculação de *Azospirillum brasilense*: efeito sobre crescimento de zea mays em solo não estéril e quantificação de dna bacteriano. Dissertação: Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC. 2017.

- CASSAN F.; BOTTINI R.; SCHNEIDER G.; PICCOLI P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hidrolize conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. **Plant Physiology**. v.125: p. 2053-2058, 2001.
- CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, L.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12-19, 2009.
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.
- CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum*spp. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- CHEN, L. Q. Sweet sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. **New Phytologist**, Cambridge, v. 201, p. 1150-1155, 2014.
- COELHO, A. M. Manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Circular técnica, 96).
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 5// 2010.
- CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; ESTRADA, M. *Azospirillum* brasilense-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCÍA DE SALAMONE, I. (Ed.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 85-94, 2008.
- COTRIM, M. F.; ALVAREZ, R. C. F.; SERON, A. C. C. Qualidade fisiológica de sementes de trigo em resposta a aplicação de *Azospirillum* brasilense e ácido húmico. Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas, v. 10, n. 4, p. 349-357, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2016v10n4p349-357>
- CUNHA, F.; SILVA, N.; BASTOS, F.; CARVALHO, J.; MOURA, L.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; SOUCHIE, E. Efeito da *Azospirillum* brasilense na produtividade de milho no sudoeste goiano. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* v. 13, p. 261-272, 2014.
- DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, New York, v. 6, p. 282-286, 1988.
- DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43 p. (Circular Técnica, 88).
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 28. n9. p 871 – 879, 2001.
- DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 13:1-13, 1992.

- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., 1994, Pullman. **Proceedings**. Pullman : Washington State University, 1976. v.2, p.518-538.
- DOUGLAS, S. K.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.21, n.3, p.433-445, 1993.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Agricultura de precisão: possibilidades de manejo da adubação nitrogenada para o milho no Cerrado. Embrapa, Planaltina, v.1, n.214, p.9-37, mai. 2008. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/556775>>. Acesso em: 17 nov. 2018
- FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **ClorofilLOG: Medidor Eletrônico do Teor de Clorofila**. 2015. Disponível em: <<http://www.falker.com.br/produto-clorofilog-medidor-clorofila.php>>. Acesso em: dezembro/2016.
- FARIA, L. A. L.; NASCIMENTO, W. M. Produção de sementes de milho-doce. In: Nascimento W. M, editor. Produção de sementes de hortaliças, volume I. Brasília: Embrapa Hortaliças; 2014. p. 241-278.
- FARUQ, G., SHAMSUDDIN, Z., NEZHADAHMADI, A., PRODHAN, Z. H., & RAHMAN, M. Potentials of *Azospirillum* Spp. for improving shoot and root of a malaysian sweet corn variety (J 58) under in vitro condition. *Int J Agric Biol*, 17, 395-398, 2015.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, 2001.
- FILHO, I. A. P.; TEIXEIRA, F. T. Desenvolvimento de cultivares de milho-doce. In: FILHO, I. A. P.; TEIXEIRA, F. F. editores. O cultivo do milho-doce. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo. 2016. p. 17-37.
- FORNASIERI FILHO, D. Manual da cultura do milho. Jaboticabal: Funep, 2007. 576p
- FREITAS, R.A. Produção de sementes de milho-doce. In: CURSO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE HORTALIÇAS, 7., 2007, Brasília. Brasília: EMBRAPA, 2007.
- GARWOOD, D. L.; CREECH, R. G. Pennfresh ADX hybrid sweet corn. *HortScience*, Alexandria, v. 14, p. 645, 1979.
- GITTI, D. C.; MIRANDA, R. A. S; LOURENÇÃO, A. L. F; ROSCOE, R.. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura do milho safrinha. XII Seminario Nacional do milho safrinha. Dourados, MS. 2013.
- GUISCHEM, J. M.; ZUCARELI, C.; NAKAGAWA, J.; ZANOTTO, M. D. Fungos associados a sementes de milho doce das cultivares BR 400 (bt), BR 441 (su) e BR 402 (SU). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 247, 2001.
- GUISCHEM, J. M.; NAKAGAWA, J.; ZUCARELI, C. Qualidade fisiológica de sementes de milho-doce BR 400 (bt) em função do teor de água na colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222002000100031&lng=en&nrm=iso>. access on 01 Dec. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100031>.
- HUNTER, J.L.; TEKRONY, D.M.; MILES, D.F.; EGLI, D.B. Corn seed maturity indicators and their relationship to uptake of carbon-14 assimilate. *Crop Science*, Madison, v.31, n.5, p.1309-1313, 1991.

- HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, , 2008. p. 17-35.
- HUNGRIA, M. A.; CAMPOS, R. J. ; SOUZA, E. M. ; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v. 331, n. 1, p 413–425, 2010.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 37p. (Documentos, 325).
- HURTADO, S.M.C.; RESENDE, A.V.; SILVA, C.A.; CORAZZA, E.J.; SHIRATSUCHI, L.S. Variação espacial da resposta do milho à adubação nitrogenada de cobertura em lavoura no cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.44, n.3, p.300-309, 2009.
- JACOUD, C, JOB, D, WADOUX, P, BALLY, R.. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can J Microbiol 45: 339–342; 1999.
- JIMÉNEZ-SALGADO T.; FUENTES-RAMIREZ L. E.; TAPIA-HERNÁNDES A.; MASCARÚA-ESPARZA M.A.; MARTINEZ ROMERO E.; CABALLERO-MELADO J. Acetobacter endophytic from Coffea arábica. In: International. Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics- The Role of Biological Nitrogen Fixation, p. 212. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1997.
- KLOPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 39-43, 1989.
- KUROZAWA, C. Glossário. **Globo Rural**, disponível em <<http://globorural.teve.globo.com/GRural/0,27062,LPTO-4373-0-L-M,00.html>>, acesso em: 20/09/2016.
- KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Características do milho doce (*Zea mays* L.) para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.1, n.2, p.93-103, 2007.
- LANA, M. DO C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. Revista Ceres, v.59, p.399-405, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300016>
- LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. Revista brasileira de ciência do solo, v. 26, n. 2, 2002.
- LUCANGELLI C. AND BOTTINI R. Reversion of dwarfism in *dwarf-1* Maize (*Zea mays* L.) and *dwarf-x* Rice (*Oryza sativa* L.) mutants by endophytic *Azospirillum* spp. **Biocell** v. 20, n.3. p. 221-226, 1996
- LUCANGELLI C., AND BOTTINI R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with Uniconazole. **Symbiosis** v. 23: p. 63-72, 1997.
- LUR, H. S.; SETTER, T.L. Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p.273-280, 1993.
- MAGALHAES, F. M. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. R. Microbiol., v.15, n.4, p.246-252, 1984.
- MAGALHÃES, P.C; DURÃES, F.O.P; GOMIDE, R.L. Fisiologia da cultura do milho. In: Embrapa Milho e Sorgo, Sete-Lagoas, MG, 1995

- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. 23 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 22).
- MAGALHÃES, P. C.; LAVINSKY, A. O.; SOUZA, T. C. Aspectos fisiológicos do milho-doce. PEREIRA FILHO, I. A.; TEIXEIRA, F. F. editores. In: O cultivo do milho-doce. Brasília, 2016. **Embrapa milho e sorgo**. p.37-52.
- MAGGIO, M. A. **Acúmulo de massa matéria seca e extração de nutrientes por plantas de milho doce híbrido “tropical”**. 2006. 47p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônomo, Campinas.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.1-24.
- MARINI, D.; GUIMARÃES, V.F.; DARTORA, J.; LANA, M.C.; PINTO JÚNIOR, A.S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum* brasilense and nitrogen fertilization. *Revista Ceres*, v.62, n.1, p.117-123, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562010015>
- MINOLTA. Chlorophyll meter SPAD-502. Instruction manual. Minolta Co., Osaka, Japan. 22 p. 1989.
- MOREIRA, F. M. S.; LANGE, A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 26, p. 529-533, 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, vol. 1, no. 2, 2010, p. 74.
- MUS, F. et al. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, n. 13, p. 3698-710, Jul 01 2016.
- NAKAGAWA, A. C. S.; MARINO, T. P.; LOPES, K. B.; DALTO, P. G.; KRAUSE, M. D.; CAVALCANTE, A. P.; DIAS, H. A. C.; KOLTUN, A.; ROCKEMBACHER, R.; PAIVA, M. R. C.; MOREIRA, R. M. P.; FERREIRA, J. M. Potencial agrônomo de populações de milho superdoce portadoras do gene Brittle-2. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29. 2012, Águas de Lindoia. **Diversidade e inovações na era dos transgênicos**: resumos expandidos. Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. 1 CD-ROM.
- NERONI, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**. Piracicaba, Brazil, v.64, n.3, p.303-304, May/June 2007.
- OLIVEIRA, E. P.; SILVA, M. G.; TEODORO, P. E. Initial growth in maize in compliance of *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen rates. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 33, n. 5, p. 1242-1248, Sept./Oct. 2017
- PANDOLFO, C. M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Produtividade de milho inoculado com *Azospirillum* brasilense em diferentes doses de nitrogênio, em latossolo vermelho - safra 2011/12. EMBRAPA, 2011.
- PAULA, M. A.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, V. 14, n. 1, p. 61, 1992.

- PEREIRA, L.M; Qualidade de sementes, teor de nitrogênio e expressão gênica em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Jaboticabal, 2014.
- PERRIG, D.; BOIERO, L., MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN F.; LUNA V20. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 75: p. 1143-1150, 2007.
- PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.;SUZUKAWA, A. K.; DAN, L. G.; GODINHO, F. B. Agronomic performance of maize in response to seed inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen doses and bioregulator. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 13, n. 3&4, p. 67-73, 2015.
- PICCOLI P.; BOTTINI R. Gibberellins production in *A. lipoferum* cultures enhanced by light. *Biocell* 20:185-190, 1996.
- PICCOLI, P.; BOTTINI, R. Effect of C/N ratio, N content, pH and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis* v. 21: p. 263-264, 1994.
- RAMBO, L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; SANGOI, L.; BAYER, C.; ARGENTA, G. Monitoramento do nitrogênio na planta e no solo para predição da adubação nitrogenada em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 407-417, 2007.
- RAMBO, L., DA SILVA, P. R. F., STRIEDER, M. L., DA SILVA, A. A., SANGOI, L., & VIEIRA, V. M. Índices nutricionais de N e produtividade de milho em diferentes níveis de manejo e de adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 390-397, 2011.
- RAMOS, J. P. K; CARVALHO, W. L. S.; AZEVEDO, V. H.; AZEVEDO, P. H.; MARTINS, L.A.; DAMBRÓS, F.C.; KLEIN, A. L. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* no milho safrinha. XIV Seminario Nacional do milho safrinha. Cuiabá, MT. 2017.
- RAO, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.863-866, 1983.
- RAYMOND, J. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v.21, n.3, p. 541-554, 2004.
- REPKE, R. A., CRUZ, S. J. S., SILVA, C. J. D., 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*, v.12, n.3, p.214-226, 2013.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. Ames: State University of Science and Technology, 1993. 21p.
- RIVERA, A. A. C. Qualidade Fisiológica de sementes de milho doce sob diferentes condições de armazenamento. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 77 p, 2011.
- RIVERA, A. A. C.; PINHO, R.G.V.; GUIMARÃES, R.M.; VEIGA, A.D.; PEREIRA G.L.; PINHO, I.V. Efeito do ácido giberélico na qualidade fisiológica de sementes redondas de milho doce, sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p.247-256, 2011.
- ROESCH, L. F. W. Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul. (2007). 165p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, Wuppertal, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.
- SANGOI, L.; SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho Agrônômico do Milho em Razão do Tratamento de Sementes com *Azospirillum* sp. e da Aplicação de Doses de Nitrogênio Mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 1141-1150, 2015.
- SANTOS, P. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applicated Environmental Microbiology**. vol. 67 n. 6. p. 2790-2798, jun/2001.
- SANWO, M.M. & DEMASON, D.A. Gibberellic acid (GA₃)- induced enhancement of α-amylase activity in the aleurone of shrunken-2 maize kernels. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.81, n.8, p.987-996, 1994.
- SHEWRY, P. R.; CASEY, R. **Seed proteins**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1999.
- SEGATTO, C., CONTE, R., LAJÚS, C. R., & DA LUZ, G. L. Relação da leitura do clorofilômetro com o rendimento da cultura do milho em diferentes níveis de suprimento de nitrogênio. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 16, n. 2, p. 253-259, 2017.
- SÉRIE DE DADOS CLIMATOLÓGICOS DO CAMPUS LUIZ DE QUEIROZ DE PIRACICABA, SP – Departamento de Engenharia de Biosistemas Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo LEB- ESALQ – USP.
- SILVA, N. Melhoramento de milho doce. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA e MELHORAMENTO, 11., 1994, Piracicaba. Anais... Piracicaba: ESALQ, 1994. P1-9.
- SOUSA, S., Paes, M. C. D., & Teixeira, F. F. (2012). Milho doce: origem de mutações naturais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.
- STEENHOULDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free living nitrogen fixing closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, n.4, p. 487-506, 2000.
- STYER, R.C.; CANTLIFFE, D.J. Dependence of seed vigour during germination on carbohydrate source in endosperm mutant of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.76, n.1, p.196-200, 1984.
- STRZELCZYK E.; KAMPER M.; LI C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiology Research**. V. 149. p. 55-60, 1994.
- TEIXEIRA, Flávia França. Milho cultivado no Brasil e banco de germoplasma: uma forma de classificação da variabilidade genética. **Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico**, 2008.
- TIEN T.M.; GASKINS M.H.; HUBBELL D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effects on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology** v. 37, n. 10 p. 1024. 1979.
- TRACY, W.F. **Sweet corn**. In: HALLAUER, A.R. Specialty corn, Boca Raton. p.155-198, 2001.
- TRACY, W.F. Sweet Corn. In: **Specialty Corns**, CRC Press, p. 147-187, 1994.

- USDA. **Vegetables:** 2014 summary. New York, 2015. Disponível em: <http://www.clientadvisoryservices.com/Downloads/VegeSumm-01-29-2015.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2015.
- VOGEL, G.F.; FEY, R. Estímulo do potencial germinativo e fisiológico de centeio e triticale por *Azospirillum* brasilense, submetidos ao tratamento químico de sementes. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.15, p.493-498, 2016. <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n4p493-498>
- WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p.103-113, 1999.
- YOUSEF G. G; JUVIK, J. A. Enhancement of seedling emergence in sweet corn by markers-assisted backcrossing of beneficial QTL. **Crop Science**, Madison, v.42, p.96-104, 2002.
- ZHAO, G.; SUN, Q.; WANG, J. Improving seed vigour assessment of super sweet and sugar-enhanced sweet corn (*Zea mays saccharata*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 35, n. 3, p. 349-356, 2007.
- ZUFFO, A. M., BRUZI, A. T., DE REZENDE, P. M., DE CARVALHO, M. L. M., ZAMBIAZZI, E. V., SOARES, I. O., & SILVA, K. B. Foliar application of *Azospirillum* brasilense in soybean and seed physiological quality. **African Journal of Microbiology Research**, 10 (20), 675-680, 2016.

ANEXOS

ANEXO A. Áreas experimentais dos anos 2016 e 2017, respectivamente logo após a semeadura.

ANEXO B. Avaliação de emergência em campo (EMC) aos 20 dias após semeadura, em ambas os anos de experimento.

ANEXO C. Plantas em V4/V5, momento antes da primeira adubação de cobertura no primeiro ano (2016) e segundo ano (2017), respectivamente.

ANEXO D. Plantas em V7/V8 – após segunda adubação de cobertura e momento em que foi realizada a coleta de raízes para análise com software Winrhizo

ANEXO E. Medições de altura de plantas com trena e teor de clorofila pelo uso do equipamento SPAD.

ANEXO F. Ilustração das etapas realizadas na avaliação das raízes, sendo da esquerda para a direita: coleta das raízes em campo; retirada do excesso de solo; acondicionamento em recipientes plásticos em solução com álcool a 70%; análise computacional de imagens pelo software WinRhizo; após análise de imagem, secagem das raízes em estufa e posterior determinação da massa seca.

ANEXO G. Raízes digitalizadas pelo software WinRhizo, em que cada linha representa (de cima para baixo): imagens de raízes não inoculadas; imagens de raízes sob inoculação na dose de 2mL/kg; tratamentos inoculados com *Azospirillum* na dose de 4 mL/kg e dose de 8mL/kg de *Azospirillum*. Imagens são referentes ao experimento conduzido no ano 2016.

Dose N: 80 kg/ha

120 kg/ha

160 kg/ha

200 kg/ha

ANEXO H. Raízes digitalizadas pelo software WinRhizo, em que cada linha representa (de cima para baixo): imagens de raízes não inoculadas; imagens de raízes sob inoculação na dose de 2mL/kg; tratamentos inoculados com *Azospirillum* na dose de 4 mL/kg e dose de 8mL/kg de *Azospirillum*. Imagens são referentes ao experimento conduzido no ano 2017

ANEXO I. Plantas em R1 – momento da coleta de folhas para análise do teor de N

ANEXO J. Plantas em R2 (esquerda) e R3 (ponto de colheita – duas fotos da direita)

ANEXO K. Avaliações da espiga: medições de comprimento, número de grãos e fileiras, diâmetro e secagem de grãos em estufa para determinação do grau de umidade

ANEXO L. Avaliações realizadas em laboratório: teste de germinação e emergência de plântulas em areia