



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JUSCELINO GONÇALVES PALHETA

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* COM UREIA CONVENCIONAL E
FERTILIZANTE NITROGENADO DE EFICIÊNCIA AUMENTADA NO
CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E TEOR NUTRICIONAL EM HÍBRIDO DE
MILHO**

BELÉM - PA

2022

JUSCELINO GONÇALVES PALHETA

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* COM UREIA CONVENCIONAL E
FERTILIZANTE NITROGENADO DE EFICIÊNCIA AUMENTADA NO
CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E TEOR NUTRICIONAL EM HÍBRIDO DE
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do
título de Doutor.

Área de Concentração: Agronomia
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura
Coorientadora: Dra. Luma Castro de Souza

BELÉM – PA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P153a Palheta, Juscelino Gonçalves
Associação de Azospirillum brasileiro com ureia convencional e fertilizante nitrogenado de eficiência aumentada no crescimento, trocas gasosas e teor nutricional em híbrido de milho / Juscelino Gonçalves Palheta. - 2022.
74 f.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2022.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura
Coorientador: Profa. Dra. Luma Castro de Souza.
1. Adubação nitrogenada. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Inibidor de urease. 4. Zea mays L.. I. Okumura, Ricardo Shigueru. *orient.* II. Título
-

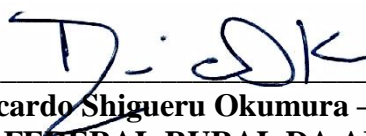
JUSCELINO GONÇALVES PALHETA

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* COM UREIA CONVENCIONAL E
FERTILIZANTE NITROGENADO DE EFICIÊNCIA AUMENTADA NO
CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E TEOR NUTRICIONAL EM HÍBRIDO DE
MILHO**

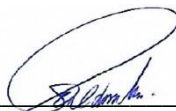
Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, para obtenção do Título de Doutor. Área de concentração: Agronomia

Aprovado em fevereiro de 2022

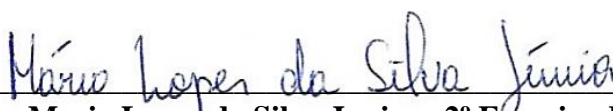
Banca Examinadora



**Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura – Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA**



**Dr. Eduardo César Medeiros Saldanha – 1º Examinador
ESPECIALISTA AGRÔNOMICO – YARA FERTILIZANTES**



**Prof. Dr. Mario Lopes da Silva Junior – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**



**Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**



**Dr. Roberto Lisboa Cunha – 4º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA**

Dedico aos meus pais, Osmarina Gonçalves Palheta e João de Oliveira Palheta
Por todo carinho, incentivo e apoio recebido ao longo dessa caminhada.
Aos meus irmãos; Janete Palheta, Sandra Maria Palheta, Orivan Palheta, Ana Suely Palheta,
Rosemiro Palheta, Paulo Palheta e Denis Palheta.
A todos os meus sobrinhos.
A minha filha Isadora Mayali Moreira Palheta e minha esposa Maria Leidiane Palheta, pelo
apoio, carinho, companheirismo, amor, respeito, atenção e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida.

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará, pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, por todo ensino e apoio durante a formação profissional.

Aos meus familiares, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Shiguero Okumura, pela oportunidade, carinho, compreensão, respeito e orientação para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Candido Ferreira de Oliveira Neto, por toda dedicação, amizade, incentivo, atenção e contribuição para a finalização desse trabalho.

A minha Coorientadora Dra. Luma Castro, pelo apoio durante a realização da escrita da tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos ensinamentos e aprendizagem.

A minha amiga Marlene Vieira, e sua Orientadora Marta Freitas, pela parceria e colaboração na realização da análise nutricional da tese.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, especialmente ao laboratório de fitotecnia, setor nutrição de plantas, pelas análises nutricionais do experimento.

Aos meus amigos Israel Amaro Santos e Gerson Albuquerque pela amizade, auxílio, compreensão e colaboração durante a realização desta tese.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores, Ana Ecídia, Jéssica Suellem, Myriam Neves, Luciana Sousa, Diana Julia, Andressa Paiva e Glauco André, por toda ajuda e fidelidade durante a condução e análises do experimento.

A minha amiga Silvia Mara, pela amizade e apoio durante essa caminhada.

À banca avaliadora pela correção e contribuição para melhoria da Tese.

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, fica aqui a minha eterna gratidão.

Muito OBRIGADO!

RESUMO

Um dos fatores limitantes na produtividade de milho no Estado do Pará é a falta de informações em relação aos benefícios da adoção de bactérias promotoras de crescimento e ao manejo da adubação nitrogenada. Em geral, os agricultores têm adaptado as recomendações de adubação do milho cultivado no Sul do país para os Estados do Norte, uma vez que os dados de pesquisa para a cultura são escassos na região. Por sua vez, em decorrência das diferenças de potencial produtivo entre os híbridos de milho, as doses de fertilizantes podem estar sendo superestimadas e/ou subestimada. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento vegetativo, fisiológico e estado nutricional do milho inoculados com *Azospirillum brasilense* associado com fontes e doses de nitrogênio. O experimento foi realizado em delineamento experimental de blocos completos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 x 2, com quatro repetições cada, assim especificado: quatro doses de N (0; 60; 120 e 180 kg ha⁻¹ de N), duas fontes de N (ureia comum e ureia tratada com inibidor de urease – NBPT) e ausência e presença de inoculação com *Azospirillum brasilense*. As avaliações constaram do crescimento vegetativo da planta, das trocas gasosas e da concentração de macronutrientes na raiz, colmo e folha de plantas de milho. Os resultados identificaram que a inoculação das sementes de milho com a bactéria e o uso da adubação nitrogenada, independentemente das fontes aplicadas, promoveu melhoria no crescimento vegetativo e nas respostas fisiológicas do milho, especialmente quando aplicado a dose de 120 kg/ha de N. O incremento nas doses de N e a inoculação com a bactéria também influenciaram a concentração de macronutrientes no milho. Contudo, a dose de 180 kg ha⁻¹ de N associada à inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* proporcionou maior concentração de macronutrientes no milho, independentemente quando aplicado a ureia comum ou ureia tratada com inibidor da urease.

Palavras-chave: Adubação nitrogenada. Fixação biológica de nitrogênio. Inibidor de urease. *Zea mays* L.

ABSTRACT

One of the limiting factors in the productivity of corn in the State of Pará is the lack of information regarding the benefits of adopting growth-promoting bacteria and the management of nitrogen fertilization. In general, farmers have adapted the recommendations for fertilizing maize grown in the south of the country for the northern states, since research data for the crop is scarce in the region. In turn, due to differences in yield potential between corn hybrids, fertilizer doses may be overestimated and / or underestimated. Thus, this study aimed to evaluate the vegetative, physiological and nutritional status of corn inoculated with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen sources and doses. The experiment was carried out in a complete randomized block design, in a 4 x 2 x 2 factorial scheme, with four replicates each, as specified: four doses of N (0; 60; 120 and 180 kg ha⁻¹ of N), two sources of N (common urea and urea treated with urease inhibitor - NBPT) and absence and presence of inoculation with *Azospirillum brasilense*. The evaluations consisted of the vegetative growth of the plant, the gas exchange and the concentration of macronutrients in the root, stem and leaf of the corn. The results identified that the inoculation of the corn seeds with the bacteria and the use of nitrogen fertilization, regardless of the sources, promoted an improvement in the vegetative growth of the hybrid, improving the vegetative development and the physiological responses of corn, especially when applied at 120 kg ha⁻¹ of N. The increase in N doses and inoculation with the bacterium also influenced the concentration of macronutrients in corn. However, the dose of 180 kg ha⁻¹ of N associated with seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, provided a higher concentration of macronutrients in corn, regardless of the application of common urea or urea treated with a urease inhibitor.

Key words: Nitrogen fertilization. Biological nitrogen fixation. Urease inhibitor. *Zea mays* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Umidade relativa do ar, temperaturas máximas e mínimas da área experimental, durante o período de condução do experimento no ano de 2019, em Belém, Pará, Brasil 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análises físicas e químicas do solo, antes da semeadura do milho.....	47
Tabela 2- Resumo da análise de variância, aplicado no diâmetro do colmo (DC), altura da planta (AP), área foliar (AF), número de folha (NF), massa seca da folha (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), massa seca do colmo (MSC) e massa seca das raízes (MSR) em conformidade com a fonte (F) a inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> (I), e a dose de nitrogênio (D).....	47
Tabela 3- Resumo da análise de variância, aplicado na fotossíntese (A), carbono interno (Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), relação carbono interno e externo (Ci/Ca), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), Clorofila total (Chl total), antocianina e carotenoides (CAR) em conformidade com a fonte (F), a inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> (I), e a dose de nitrogênio (D).....	48
Tabela 4- Desdobramento da interação tripla (Fonte x Inoculação x Dose) com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada ao teor de clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total), antocianina e diâmetro do colmo (DC) em híbrido de milho sem e com inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>	49
Tabela 5- Desdobramento do efeito do N, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada a altura da planta (AP), área foliar (AF), massa seca do colmo (MSC), massa seca da raiz (MSR) Fotossíntese (A) e Condutância estomática (gs) em híbrido de milho submetido a doses nitrogenadas.....	49
Tabela 6- Desdobramento do efeito dose da análise de variância com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada ao número de folha (NF), massa seca da folha (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), fotossíntese (A), Condutância estomática (GS) e carotenoides (CAR) em híbrido de milho, submetida à ausência e presença de <i>Azospirillum brasilense</i> e a dose de nitrogênio.....	50
Tabela 7- Resumo da análise de média da interação Fonte x Inoculação, em conformidade com ausência e presença de <i>Azospirillum brasilense</i> em semente de milho, na transpiração ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração de clorofilas a ($\text{mmol kg}^{-1}\text{MF}$).....	50
Tabela 8- Desdobramento da interação Fonte x Dose, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na relação de carbono interno e externo (Ci/Ca), transpiração (E), clorofila a (Chl a) e carotenoides (CAR), em semente de híbrido de milho submetida a diferentes fontes de nitrogênio.....	51
Tabela 9- Análises físicas e químicas do solo, antes da semeadura do milho.....	69

Tabela 10- Resumo da análise de variância, aplicado no conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) na folha, colmo e raiz de híbrido de milho, em conformidade com as doses de nitrogênio (D), inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> (I) e fontes (F) nitrogenadas.....	69
Tabela 11- Desdobramento da interação fontes x inoculação x doses, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca) na folha e teor de potássio (K), fosforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) na raiz de híbrido de milho na ausência e presença da inoculação com <i>Azospirillum</i>	70
Tabela 12- Desdobramento do efeito das doses de nitrogênios, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de nitrogênio (N), fosforo (P), potássio (K) e enxofre (S) no colmo do milho submetido a diferentes doses nitrogenadas.	71
Tabela 13- Resumo da análise de média da interação fontes x inoculação, em conformidade com ausência e presença de <i>Azospirillum brasilense</i> em semente de milho, na concentração de nitrogênio (N) no colmo, de fosforo (P) na folha, de enxofre (S) no colmo, de enxofre (S) na raiz, em plantas de milho (g kg^{-1})......	71
Tabela 14- Desdobramento da análise de variância com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de enxofre (S) na raiz em híbrido de milho, submetida à ausência e presença de <i>Azospirillum brasilense</i> e a dose de nitrogênio.....	71
Tabela 15- Desdobramento da interação fontes x doses, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de nitrogênio (N) na raiz, fosforo (P) na folha, cálcio (Ca) no colmo, magnésio (Mg) na folha, enxofre (S) na raiz em semente de híbrido de milho submetida a diferentes fontes de nitrogênio.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- A- Taxa de assimilação líquida de CO₂
- AF- Área foliar
- AP- Altura da planta
- ATP- Trifosfato de adenosina
- CAR- Carotenoides
- Ci/Ca- Relação carbono interno e externo.
- CTC- Capacidade de troca catiônica
- CHL Total- Clorofila total
- CHL *a*- Clorofila *a*
- CHL *b*- Clorofila *b*
- Ci- Concentração intercelular de CO₂
- MF- Matéria fresca
- MSF- Matéria seca folha
- NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NF- Número de folha
- MSC- Massa seca do colmo
- MSPA- Matéria seca da parte aérea
- MSR- Matéria seca da raiz
- MST- Matéria seca total
- N₂- Nitrogênio atmosférico
- NBPT- Tiofosfato de N- (n-butil) triamida
- DC- Diâmetro do colmo
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- DP- Desvio - padrão
- E*- Transpiração foliar
- g*_s- Condutância estomática
- PAR- Radiação fotossinteticamente ativa
- R/PA- Relação entre a matéria seca radicular e a matéria seca da parte aérea
- RNA- Ácido ribonucleico
- RuBisCo- Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	21
2 FONTES E DOSES DE NITROGÊNIO ASSOCIADO À INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i> NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DO MILHO NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	30
2.1 Introdução.....	31
2.2 Material e métodos.....	32
2.2.1 Caracterização da área e análise de solo.....	32
2.2.2 Delineamento experimental.....	33
2.2.3 Origem e semeadura das sementes.....	33
2.2.4 Aplicação dos tratamentos.....	33
2.2.5 Fenologia e medição de plantas.....	33
2.2.6 Avaliação das trocas gasosas.....	34
2.2.7 Determinação dos pigmentos fotossintéticos.....	35
2.2.8 Análise estatística.....	35
2.3 Resultados.....	35
2.3.1 Crescimento da planta e rendimento de biomassa.....	35
2.3.2 Trocas gasosas.....	36
2.3.2.1 Taxa de assimilação líquida da fotossíntese (<i>A</i>).....	37
2.3.2.2 Condutância estomática (<i>g_s</i>).....	37
2.3.2.3 Transpiração (<i>E</i>).....	37
2.3.2.4 Relação carbono interno e externo (<i>C_i/C_a</i>).....	37
2.3.3 Pigmentos fotossintéticos.....	38
2.4 Discussão.....	39
2.5 Conclusão.....	41
2.6 Agradecimentos.....	42
2.7 Referências.....	43
3 <i>Azospirillum brasilense</i> ASSOCIADO COM ADUBAÇÃO NITROGENADA PROMOVE MELHORIA NOS TEORES DE MACRONUTRIENTES DO MILHO.....	52
Resumo.....	52

Abstract.....	53
3.1 Introdução.....	54
3.2 Material e métodos	55
3.2.1 Descrição da área e análise do solo.....	55
3.2.2 Delineamento experimental e condução do experimento	55
3.2.3 Avaliações nas plantas.....	56
3.2.4 Avaliação nutricional.....	56
3.2.5 Análise estatísticas.....	57
3.3 Resultados.....	57
3.3.1 Concentração de macronutriente na folha do milho.....	57
3.3.2 Concentração de macronutriente no colmo do milho.....	58
3.3.3 Concentração de macronutriente na raiz do milho.....	59
3.4 Discussão.....	60
3.4.1 Concentração de macronutriente na folha do milho.....	60
3.4.2 Concentração de macronutriente no colmo do milho.....	61
3.4.3 Concentração de macronutriente na raiz do milho.....	62
3.5 Conclusão.....	63
3.6 Agradecimentos.....	64
3.7 Referências.....	65
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	74

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura expressivamente cultivada no Brasil e no mundo, sendo primordialmente utilizado na alimentação animal, por meio da produção de ração e nutrição humana na forma de farinhas, óleos, flocos e etc., além do uso na indústria de alta tecnologia para produção de etanol (SANTOS et al., 2018). Em relação à produção mundial de milho, os Estados Unidos despontam como maior produtor mundial, com cerca de 34,5% (371 milhões de toneladas), seguido da China, com 24,5% (263 milhões de tonelada) e o Brasil com 7,6% (82 milhões de toneladas), juntos esses países são responsáveis por cerca de 66,5% da produção desse grão (CONTINI et al., 2019). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, na safra 2020/2021 o Brasil fecha o ciclo com um volume de 252,3 milhões de toneladas (CONAB, 2020).

No Brasil, as regiões Sudeste e Centro-Oeste são as de maior produção nacional, representado pelos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso (CONAB, 2020). Com o crescimento do setor agropecuário, principalmente a avicultura e suinocultura, há tendência de estímulo do consumo interno de grão (COÊLHO, 2018), sendo assim, é imprescindível o investimento em tecnologias que diminuam o custo de produção e elevem a produtividade agrícola, uma vez que se trata de uma cultura expressivamente cultivada no país, com grande demanda e potencial de crescimento (PEREIRA, 2014).

No Estado do Pará o milho é o sexto alimento mais cultivado, perdendo para mandioca, dendê, soja, açaí e cana-de-açúcar (FAPESPA, 2017). No entanto, existe uma perspectiva de expansão da fronteira agrícola para a produção de grãos na região Norte e Nordeste do país, considerando o atual cenário do agronegócio brasileiro. Esta estimativa se baseia no avanço do plantio mecanizado de grãos para a região amazônica. Além disso, existe uma melhoria da infraestrutura por meio da construção de rodovias, hidrovias, portos, armazéns e ferrovias decorrentes de investimentos públicos e do setor privado, que estão em execução na região, aumentando e inserindo o Pará como potencial produtor de grãos do país.

Diante da expectativa de crescimento do cenário agrícola na região Norte do país, em especial a produção de grãos, interligada a constante necessidade de cultivo de alimento e da busca pela ampliação do sistema produtivo agrícola (PEREIRA, 2014), além da baixa fertilidade natural dos solos, principalmente com relação ao nitrogênio, já que os solos brasileiros de forma geral não fornecem a quantidade ideal de nutrientes para garantir produtividade agrícola (GUIMARÃES, 2006), já que os solos localizados em regiões tropicais, por ser altamente intemperizados, apresentam baixa disponibilidade de

macro e micronutrientes para o desenvolvimento de culturas de cereais (GALINDO et al., 2018).

O N é um dos principais macronutrientes responsáveis pela manutenção da produtividade vegetal, sendo responsável pela formação das características morfológicas das folhas e caules, além do desenvolvimento de perfilho, composição das moléculas de ácidos nucleicos, clorofilas, fonte de informação genética, proteínas, formação de enzimas, participação nas rotas metabólicas, funções estruturais e transportes de nutrientes, além da constituição da matéria seca e melhoria da qualidade de forragem (TAIZ; ZEIGER, 2013; NOVOA; LOOMIS, 1981; OKUMURA et al., 2011). Tornando a fertilização nitrogenada uma técnica essencial para aumento do potencial produtivo das plantas (JUAREZ LAGUNES et al., 1999; MARTHA JÚNIOR; CORSI, 2000; TEUTSCH et al., 2005; ALOIVISI et al., 2018).

Aproximadamente 98% do N presente no solo encontra-se na forma orgânica e somente 2% nas formas absorvíveis pelas plantas (MALAVOLTA, 2006). Para ser assimilado pelo vegetal o nitrogênio precisa estar na forma inorgânica de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), as quais são absorvidas pelas plantas (FAQUIN, 2005; FORNASIERI FILHO, 2007). O nitrogênio apesar de ter alta concentração na atmosfera, onde 78% do ar atmosférico é composto por N_2 , parte desse nutriente encontra-se na forma não disponível pela planta, pois necessita de uma grande quantidade de energia para a quebra da ligação tripla da molécula, para disponibilizar o N para os vegetais na forma assimilável (REIS; TEIXEIRA, 2005).

O fornecimento de N via fertilizantes minerais é um dos principais fatores responsáveis pelas elevações dos custos de produção das culturas, uma vez que a conversão industrial, por meio da quebra das moléculas de N_2 para a obtenção dos adubos nitrogenados é um processo oneroso e de elevado custo (PEREIRA, 2014). Portanto, o manejo da adubação nitrogenada deve ser realizado para garantir maior produtividade vegetal e redução dos custos de produção (TEIXEIRA FILHO et al., 2014).

Diante disso, o N torna-se um fator limitante para o incremento da produtividade agrícola, já que o trigo, milho e arroz são responsáveis pelo consumo de aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados produzidos no mundo (ESPÍNDULA et al., 2014; VETTORAZZI et al., 2019). Além disso, existe a necessidade da seleção de doses adequadas de N, seguindo exigência nutricional da cultura (GALINDO et al., 2018), uma vez que a escolha de doses de N é uma decisão agronômica importante que os agricultores assumem, já que os custos de fertilizantes são elevados.

Para alcançar maior produtividade e rendimento de grãos de milho são aplicadas altas doses de nitrogênio (N), já que os solos não suprem a demanda necessária das culturas ao longo

do seu ciclo produtivo (GALINDO et al., 2017). No entanto, parte do N aplicado para suplementar as colheitas pode ser lixiviado ou volatilizado para o meio ambiente na forma de amônia (NH₃), monóxido de nitrogênio (NO) que contribuem para um aumento do efeito estufa (SOUZA et al., 2019). Diante disso, existe a necessidade de meio de cultivo que favoreça o rendimento agrícola e possibilite uma melhoria na recuperação dos níveis de N no solo e nos fertilizantes, visando um melhor uso interno de N pela planta (BARRACLOUGH et al., 2014). Além disso, permanece uma cobrança ou exigência de diversos seguimento das sociedades de adoção de práticas agrícolas que melhorem a sustentabilidade do meio ambiente, especialmente em relação à gestão nutricional (GALINDO et al., 2018).

A busca por sistema de produção que atenda a demanda nutricional do milho com reduzido custo de produção e economicamente sustentável, vem sendo almejada por pesquisadores de todo mundo. Visando reduzir o impacto ambiental ao meio ambiente, além da constante necessidade de elevar a produção agrícola, garantido assim a segurança alimentar para população em crescimento e com ênfase em sistema agrícola sustentável, levaram ao interesse no uso de inoculante contendo bactérias que promovem o crescimento das plantas e melhoram o rendimento das culturas sem prejudicar o meio ambiente (HUNGRIA et al., 2010; COSTA et al., 2015). Com base nisso, alguma alternativa vem sendo estudada, como por exemplo o uso de bactéria diazotróficas, capazes de fixar N, através de associações com sistemas radiculares das plantas, para obtenção de nitrogênio, por meio da fixação biológica. Perante o exposto, várias bactérias associativas foram isoladas da cultura de milho, com ênfase nas espécies *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, onde podemos destacar o gênero *Azospirillum*, sendo o mais estudado (REIS et al., 2000). Essas bactérias são encontradas naturalmente na rizosfera, colonizando os tecidos internos da raiz, onde são capazes de promover o crescimento das plantas, através da fixação de N, além de produzir fito-hormônios como ácido indolacético, citocininas, giberelinas e etileno (DE SOUZA et al., 2010). Tais bactérias tem o potencial de se associar endofiticamente às várias espécies de gramínea, auxiliando no crescimento vegetal, por meio da disponibilização de N prontamente disponível, auxiliando dessa forma no crescimento e desenvolvimento vegetal (DA SILVA, 2013). Além disso, esse microrganismo quando associado simbioticamente no sistema radicular, pode favorecer o crescimento vegetal, através da produção e secreção de reguladores de crescimento de planta, que são capazes de aumentar e beneficiar o crescimento do sistema radicular e, assim melhorar a nutrição mineral das plantas, além de favorecer a absorção de água, possibilitando mais tolerância contra as secas e a salinidade (BASHAN et al., 2006; ALOIVISI et al., 2018).

É importante destacar que esse gênero de bactérias possui um complexo enzimático, com potencial de redução do N_2 atmosférico em amônia e posteriormente em amônio, através da quebra da ligação tríplice do N, podendo ser transportado para fora da célula bacteriana, sendo rapidamente assimilado pela célula vegetal sob a forma de glutamina (DA SILVA, 2013). No entanto, é importante salientar que a enzima nitrogenase é uma molécula de molibdênio ferro proteína que hidrolisa 16 adenosinas trifosfatos (ATP) e transfere 8 elétrons por molécula de N fixado, nesse caso, há necessidade de uma grande demanda energética para as células vegetais. Além disso, em virtude dos elevados custo energéticos das bactérias fixadoras de nitrogênio, outros fatores regulam a atividade da nitrogenase, como por exemplo a concentração de O_2 , disponibilidade energética da célula, idade fisiológica (RODRIGUES et al., 2006), concentração de N disponível na forma de amônio (PRAKAMHANG et al., 2009). Portanto, as bactérias diazotróficas podem ampliar a absorção de nitrogênio pela planta, reduzindo a quantidade de adubo mineral a ser aplicado, estimulando o crescimento vegetal, promovendo o aumento da atividade da redutase do nitrato (CASSÁN et al., 2008; DA SILVA, 2013), como resultado diminuição dos impactos ambientais provocado pelo excesso de adubo nitrogenado.

Dentre os microrganismos que estão em estudo, podemos destacar o gênero *Azospirillum spp.* Essas bactérias são capazes de melhorar a interação com as plantas, principalmente o grupo das monocotiledôneas (MOREIRA, 2007; JADOSK et al., 2016), podendo contribuir com a nutrição nitrogenada, principalmente das plantas de milho, arroz, trigo, arroz, sorgo, bananeira e abacaxizeiro (DOBEREINER; DAY, 1976; DOBEREINER, 1991; GUNARTO et al., 1999; CRUZ et al., 2001; GERHARDT, 2012).

Os *Azospirillum spp.* São bactérias gram-negativas, em forma de bastonetes uniflagelados, de vida livre, com alta mobilidade no solo e um versátil metabolismo de carbono e nitrogênio que aferem a aptidão para o crescimento em ambiente competitivo da rizosfera (HALL; KRIEG, 1984; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). O *Azospirillum brasilense* tem grande potencial de uso como biofertilizante (GERHART, 2012), devido à capacidade de colonizar raízes de várias espécies de plantas, além da ampla distribuição geográfica e eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro* (PEDROSA, 1987).

O gênero *Spirillum* foi relatado primeiramente por BEIJERINCK (1925), sendo posteriormente reclassificados como *Azospirillum*, em função do seu potencial para fixação de nitrogênio atmosférico (N_2). No Brasil foi descrito por Dr. Johanna Döbereiner em 1970 (TARRAND et al., 1978). Em seguida várias pesquisas avaliaram o potencial de fixação de N, visando reduzir o uso do fertilizante mineral, apresentando resultados promissores, dentre estes estudos podemos destacar; (CASSAN et al., 2015;

MARCAS et al., 2015; OKON et al., 2015; FUKAMI et al., 2016; PEREG et al., 2016; HUNGRIA et al., 2016; FUKAMI et al., 2018.)

Apesar dos benefícios da associação serem atribuídos principalmente à capacidade de fixação de N₂ pelo *Azospirillum brasilense*, alguns trabalhos descrevem outras propriedades que implicam na promoção do crescimento vegetal (FUKAMI et al., 2018), como por exemplo a síntese de hormônios vegetais, como auxinas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2015), citocininas (TIEN et al., 1979), as giberelinas (BOTTINI et al., 1989), o ácido abscísico (COHEN et al., 2008), o etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e ácido salicílico (SAHOO et al., 2014). Além de fatores como solubilização do fósforo inorgânico (TURAN et al., 2012), mitigação do estresse abiótico (KIM et al., 2012), indução de tolerância sistêmica (YANG et al., 2009), atenuação do efeito excessivo de metais pesados (BASÃ et al., 2010), controle biológico de patógenos e limitação da disponibilidade do ferro para fitopatógenos (TORTORA et al., 2011). Além disso, foi relatado que a inoculação com *Azospirillum brasilense* aumenta o conteúdo de prolina em brotos e raízes, melhora a concentração hídrica no apoplastos, proporciona maior elasticidade da parede celular, aumenta o teor de clorofila e pigmentos de foto-proteção, melhora a condutância estomática e eleva a produção de biomassa (BULEGON et al., 2017). Diante desses diversos mecanismos de ação para promoção do crescimento da planta, Basã (2010) relata a “teoria de mecanismos múltiplos”, ou seja, o efeito promotor do crescimento do *Azospirillum* pode não estar somente relacionado a um único mecanismo. Segundo o princípio proposto por Bashan e Levanony (1990), essas bactérias podem favorecer uma associação planta-bactéria devido a vários fatores associativos, atuando como um padrão sequencial de efeitos positivos, resultando de ação simultânea ou consecutiva.

Importante destacar que existe uma condição ótima para a ocorrência da simbiose positiva entre a planta hospedeira e a bactérias fixadora de N, ou seja, é necessário que haja adaptabilidade dos genótipos vegetais ao microrganismo fixador, do ambiente e da sinergia existente entre os organismos em se associar (JADOSKI et al., 2016), ou seja, o tripé genótipo x ambiente x fenótipo torna-se fundamental para o sucesso das interações, entre microrganismos fixadores de N e os diferentes gêneros vegetais (SMITH et al., 1984).

A simbiose positiva entre este microrganismo tem sido relatada na literatura por diversos pesquisadores, onde resultados promissores demonstram que a inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho resulta em ganho de matéria seca e produção de grãos, particularmente quando envolve genótipos não melhorados geneticamente na presença de baixa concentração de N (REIS JUNIOR et al., 2008).

No Brasil, o uso de *Azospirillum brasilense* como biofertilizante foi aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para as culturas de milho e trigo (GERHARDT, 2012). No entanto, somente em 2009 que o primeiro inoculante comercial contendo a bactéria começou a ser comercializada no país (HUNGRIA et al., 2010). Desde então, cerca de 3 milhões de doses de inoculante são aplicadas anualmente pelos agricultores, para culturas não leguminosas e leguminosas (FUKAMI et al., 2018). Para Hungria et al. (2010), o uso de *Azospirillum brasilense* pode economizar bilhões em fertilizantes minerais, permitindo diminuição nos custos de transporte, além de possibilitar redução da poluição ambiental.

Embora vários benefícios possam ser encontrados na literatura quando associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho, o aumento da produtividade na cultura pode não ser observado, exigindo mais estudos envolvendo a bactéria fixadora visando maximizar sua influência no desenvolvimento e produtividade da planta. Além disso, ainda faltam pesquisas para definir quanto fertilizante nitrogenado precisa ser aplicado em combinação com *Azospirillum brasilense* para alcançar um melhor gerenciamento da fertilização com N e maximizar o rendimento de grãos de milho (GALINDO et al., 2019).

É válido ressaltar que o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo é a ureia (IFA, 2020), apesar dessa fonte se destacar pela elevada concentração de nitrogênio, menor preço de N por unidade de fertilizante, reduzido efeito corrosivo quando comparado a outras fontes, alta solubilidade e facilidade de mistura com outras fontes, apresenta desvantagem como elevada suscetibilidade à volatilização de amônia (NH_3), fitotoxicidade do biureto e perdas via lixiviação, principalmente em regiões tropicais como o Brasil, onde há predomínio de altas temperaturas e elevada precipitação (FRAZÃO et al., 2014).

Diversos estudos relataram que as perdas em decorrência da volatilização por amônia (NH_3), provocada pela aplicação superficial da ureia, podem alcançar de 20 a 30% do nitrogênio aplicado (WATSON et al., 1994; LARA CABEZAS et al., 2000; CANTARELLA et al., 2003, SOARES, 2011). No Brasil, a fertilização nitrogenada no milho é realizada em cobertura, sendo aplicado principalmente em superfície sem incorporação ao solo, no entanto, devido ao caráter higroscópico das partículas de ureia, aliada a condições climáticas do país, esses fatores podem favorecer as perdas por volatilização (GALINDO et al., 2020). Segundo Tasca et al. (2011), cerca de 50% do N aplicado em superfície sobre o solo foram perdidos por volatilização de amônia.

Cabe destacar que vários fatores comprometem a hidrólise da ureia, como por exemplo, a temperatura, umidade, pH do solo, capacidade de troca catiônica (CTC), tipo e presença de

resíduos de plantas nas superfícies do solo, uma vez que esses fatores podem promover elevação da quantidade e atividade da enzima urease nos solos (CABRERA et al., 1991; CANTARELLA et al., 2008; LANNA et al., 2010).

Devido à alta demanda nutricional de N pelo milho e as perdas de N as quais a ureia é suscetível, são imperativas a busca por alternativas que promovam ou favoreçam a eficiência da fertilização nitrogenada. Uma opção que vem sendo muito estudada é a utilização de adubos nitrogenados de eficiência aumentada, como os de liberação lenta ou controlada, cujos objetivos visam reduzir os processos de perdas por volatilização do N (FRAZÃO et al., 2014). Dentre os produtos testados, a moléculas de NBPT [N - (n-butil) tiofosfórico triamida], tem demonstrado capacidade e eficiência na redução das perdas de N (GANS; HERBST; MERBACH, 2006; CANTARELLA et al., 2008; SCIVITTARO et al., 2010; OKUMURA et al., 2013).

O NBPT é uma molécula que age inibindo a ação da enzima urease, pois ocupa a região do centro ativo da partícula, provocando uma redução na atividade enzimática (CHRISTIANSON; BYRNES; CARMONA, 1990; WATSON, 2000; CANTARELLA et al., 2007), refletindo na redução de perdas de amônia por volatilização (CANTARELLA et al., 2008), além disso, o atraso na hidrólise da ureia possibilita a redução da concentração de NH_3 na superfície do solo, diminuindo o potencial de volatilização, além de aumentar a incorporação desse nutriente no perfil do solo (RAWLUK; GRANT; RACZ, 2001; OKUMURA et al., 2013).

Vários pesquisadores são enfáticos em afirmar que adição de inibidor à urease tem diminuído a volatilização de amônia em cerca de 60%, possibilitando um aumento na eficiência do N e da produtividade das culturas (WATSON et al., 1994; TRENKEL, 1997; RAWLUK et al., 2001; CANTARELLA et al., 2009; SOARES, 2011). No entanto, importante ressaltar que alguns estudos como o relatado por Prando et al. (2013), mostraram que o uso de NBPT no Brasil não identificou melhoria significativa no rendimento de grãos quando comparado a ureia convencional, divergindo aos resultados observados em países localizados em condições temperadas (GALINDO et al., 2019).

Normalmente empresas comercializam ureia tratada com o NBPT, porém surgem dúvidas referentes à estabilidade de inibidor após sua aplicação, pois, o produto tende a reduzir a sua eficiência com o decorrer do tempo de armazenamento, além disso, algumas pesquisas em áreas tropicais relatam não haver melhoras no rendimento de grãos quando comparado à ureia tradicional, sugerindo novos estudos em tais condições (GALINDO et al., 2017). Além do mais, há dúvidas referentes à influência do pH do solo na redução da eficiência do NBPT, já que existem evidências que o inibidor seja mais eficiente em solos com alto valor de pH e reduzido teor de matéria orgânica (WATSON et al., 1994). Esse assunto ainda é pouco

abordado cientificamente, existindo muitas dúvidas que precisam ser resolvidas. Além de ser de interesse para a agricultura, uma vez que a maior parte dos solos brasileiros tem reação ácida (SOARES, 2011).

Portanto, para garantir a produção de alimento de forma constante são necessárias práticas agrícolas que visem maximizar a produção com base no modelo de conservação ambiental, ou seja, baseado no modelo sustentável de produção, com foco no incremento da produtividade e com impacto mínimo sobre o meio ambiente (SÁ et al., 2017; FUKAMI et al., 2018). Diante disso, as práticas de manejo de N devem incluir uma determinação da quantidade de N necessária para maximizar a produção agrícola, sem prejudicar a lucratividade econômica do sistema, além de manter ótimas condições ambientais (GALINDO et al., 2016; GALINDO et al., 2019).

Diante dos fatos mencionados acima, os pesquisadores buscam umas alternativas viáveis economicamente e sustentáveis ambientalmente corretas que possibilitem uma melhoria na eficiência da fertilização nitrogenada, com redução no uso de nitrogênio sem promover diminuição na produtividade vegetal. Portanto, mais estudos envolvendo *Azospirillum brasilense* são necessários para potencializar a influência no desenvolvimento das plantas e na sua produtividade, além disso, faltam pesquisas para a definição da quantidade de N mineral a ser aplicada em combinação com essa bactéria, visando maximizar o crescimento e rendimento de milho, além da carência de informações referentes ao potencial do uso de *Azospirillum brasilense* em combinação com NBPT quanto à eficiência do uso de nitrogênio na cultura do milho (GALINDO et al., 2020).

Além disso, apesar de muitos trabalhos de pesquisa com N terem sido realizados em diversas localidades para a cultura do milho, poucos estudos têm sido desenvolvidos na região Norte do Brasil, em especial no Estado do Pará e, conseqüentemente muitas dúvidas têm surgido sobre os benefícios da adoção de *Azospirillum brasiliense* e fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada, assim como uma recomendação de dose adequada para a produção de milho na região amazônica.

Diante disso, a Hipótese geral deste trabalho é que a inoculação com *Azospirillum brasilense*, ureia convencional e fertilizantes nitrogenado de eficiência aumentada na cultura do milho melhoram o crescimento vegetativo, as trocas gasosas e o estado nutricional do híbrido de milho. O objetivo geral do estudo foi avaliar o crescimento vegetativo, desenvolvimento fisiológico e estado nutricional do milho inoculados com *Azospirillum brasilense* associado com diferentes fontes e doses de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- BARRACLOUGH, P. B; LOPEZ-BELLIDO, R; HAWKESFORD, M. J. Variação genotípica na absorção, particionamento e remobilização do nitrogênio durante o enchimento de grãos no trigo. **Field Crop Res**, v.156, p. 242 - 248, 2014.
- BASÃ, Y; DE-BASÃ, L. E. Como o que promove o crescimento da planta bactéria *Azospirillum* promove crescimento de uma planta avaliação crítica. **Adv Agron**, v.108, p. 77 - 136, 2010.
- BASHAN, Y. *et al.* Aumento de pigmentos fotossintéticos fotoprotetores auxiliares em mudas de trigo induzidas por *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Solo**, v. 42, p. 279 - 285, 2006.
- BASHAN, Y. LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum inoculation* technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591 - 608. 1990.
- BEIJERINCK, M. W. **Uber ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Abt.** p. 353, 1925.
- BOTTINI, R. *et al.* Identificação de giberelinas A1, A3, e iso-A3 em culturas de *Azospirillum lipoferum*. **Physiol planta**, v. 90, p. 45 - 47, 1989.
- BULEGON, L. G. *et al.* Atividade enzimática, troca gasosa e produção de soja co-inoculada com '*Bradyrhizobium japonicum*' e '*Azospirillum brasilense*'. **Aust J Crop Sci**, v.11, p. 888 - 896, 2017.
- CABRERA, M. L; KISSEL, D. E; BOCK, B. R. Urea hydrolysis in soil: effects of urea concentration and soil pH. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p.1121 - 1124, 1991.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. *In*: NOVAIS, R. F; ALVAREZ, V. V. H; BARROS, N. F; FONTES, R.L. F; CANTARUTTI, R. B; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS: 2007. p. 375 - 470.
- CANTARELLA, H; BOLONHEZI, D; GALLO, P.B; MARTINS, A.L.M; MARCELINO, R. Ammonia volatilization and yield of maize with urea treated with urease inhibitor. *In*: **Nitrogen Workshop**, Turin: 2009. p. 129 - 130.
- CANTARELLA, H. *et al.* Fruit yield of Valencia sweet orange fertilized with different N sources and the loss of applied N. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 67, p. 215 - 223, 2003.
- CANTARELLA, H; BOLONHEZI, D; GALLO, P.B; MARTINS, A.L.M; MARCELINO, R. Ammonia volatilization and yield of maize with urea treated with urease inhibitor. *In*: **Nitrogen Workshop**, Turin: 2009. p. 129 - 130.
- CANTARELLA, H. *et al.* Fruit yield of Valencia sweet orange fertilized with different N sources and the loss of applied N. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 67, p. 215 - 223, 2003.

CANTARELLA, H. *et al.* Ammonia volatilization from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 397 - 401, 2008.

CASSÁN, F. D; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p. 95 2008.

CASSAN, F. D; OKON, Y; CREUS, C. M. *Handbook for Azospirillum*. Suíça: **Springer, Basel**. v. 10, p. 978, 2015.

CHRISTIANSON, C. B; BYRNES, B. H; CARMONA, G. A. comparison of the sulfur and oxygen analogs of phosphoric triamide urease inhibitors in reducing urea hydrolysis and ammonia volatilization. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 26, p. 21 - 27, 1990.

COÊLHO, J D. Produção de grãos: feijão, milho e soja. Caderno Setorial ETENE, Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, v. 2, n. 19, p. 1 - 13, 2018.

COHEN, A. C; BOTTINI, R; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp. 245 produz ABA em meio de cultura quimicamente definido e aumenta o teor de AAB em plantas de Arabidopsis. **Plant Growth Regul**, v. 54, p. 97 - 103, 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Acompanhamento da Safra Brasileira Safra 2020/21, v. 8, p. 1 - 84, 2020.

CONTINI, E. *et al.* Milho: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília: **Embrapa Milho e Sorgo**. 2019.

COSTA, R. R. G. F. *et al.* Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second -harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 304 - 311, 2015.

CRUZ, J. L. **Efeitos de níveis de nitrato sobre o metabolismo do nitrogênio, assimilação do CO₂ e fluorescência da clorofila a em mandioca**. Orientador: Paulo Roberto Mosquim. 2001. 87f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2001.

DA SILVA, L. M. M. **Desempenho agrônomico de milho em função do tratamento de sementes com azospirillum brasiliense sob diferentes doses de nitrogênio mineral**. Orientador: Luis Sangoi.2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages: Santa Catarina. 2013.

DE SOUZA MOREIRA, F. M. *et al.* Bactérias diazotróficas associadas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 1, p. 74 - 99, 2010.

DOBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). **The Prokaryotes**, v. 3, p.2236 - 3353, 1991.

DOBEREINER, J; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixin sites. *In*: NEWTON, N. E; NYMAN, C. J; Proceedings of the 1st International Joint Symposium. **Nitrogen fixation**, Washington Uni. Press, 1976. v.2, p.518 - 38,

ESPÍNDULA, M. C. *et al.* Inibidor de urease (NBPT) e eficiência da aplicação única ou dividida de ureia na cultura do trigo. **Revista Ceres**, v. 61, p. 273 - 79, 2014.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. II. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente. Lavras: UFLA/FAEPE, p.81 - 91, 2005.

DA SILVA, L. M. M. **Desempenho agrônomico de milho em função do tratamento de sementes com azospirillum brasiliense sob diferentes doses de nitrogênio mineral**. Orientador: Luis Sangoi.2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages: Santa Catarina. 2013.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da Cultura do Milho**. Jaboticabal: Funep, 576 p, 2007.

FRAZÃO, J. J. *et al.* Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.1262 - 1267, 2014.

FUKAMI, J; CEREZIN, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express** 8, v.73, 2018.

FUKAMI, J. *et al.* Accessing inoculation methods of maize and wheat with, *Azospirillum brasiliense*. **AMB Express** 6, p.3 - 16, 2016.

FUNDAÇÃO AMAZÔNIA DE AMPARO A ESTUDOS E PESQUISAS DO PARÁ. **Boletim Agropecuário do Estado do Pará**. 2017. Disponível em: <http://www.fapespa.pa.gov.br/upload/Arquivo/anexo/1383.pdf?id=1533567716>. Acesso em: 20 de setembro, 2020.

GALINDO, F. S. *et al.* Inoculation of *Azospirillum brasiliense* associated with silicon as a liming source to improve nitrogen fertilization in wheat crops. **Scientific reports**, v. 10, 2020.

GALINDO, F. S. *et al.* Nitrogen fertilisation efficiency and wheat grain yield affected by nitrogen doses and sources associated with *Azospirillum brasiliense*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Sec. B - Soil Plant Sci.* v. 69, p. 606 - 617, 2019.

GALINDO, F. S. *et al.* Can silicon applied to correct soil acidity in combination with *Azospirillum brasiliense* inoculation improve nitrogen use efficiency in maize. **PloS one**, v. 15, p. 230 - 954, 2020.

GALINDO, F. S. *et al.* Rendimento do milho e diagnóstico foliar afetados pela fertilização com nitrogênio e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. **Rev Bras Cienc Solo**. v. 40, p. 015 - 36, 2016.

GALINDO, F. S. *et al.* Efeitos da adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* na produção de trigo na região do Cerrado. **Pesq Agropec Bras**. v.52, p.794 - 805, 2017a.

GALINDO, F. S. *et al.* Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Agron. J.** v.111 p.1985 - 1997, 2019.

GALINDO, F. S. *et al.* Micronutrient Accumulation with *Azospirillum Brasilense* Associated with Nitrogen Fertilization Management in Wheat. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, p. 2429 - 2441, 2019.

GALINDO, F. S. *et al.* Economic analysis of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen sources and rates. **Semina: Ci. Agrár.** v. 38, p.1749 - 1764, 2017b.

GALINDO, F. S. *et al.* Chemical soil attributes after wheat cropping under nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Semina: Ci. Agrár**, v. 38, p.659 - 669, 2017c.

GALINDO, F. S. *et al.* Nitrogen rates associated with the inoculation of *Azospirillum brasilense* and application of Si: Effects on micronutrients and silicone concentration in irrigated corn. **Open Agric**, v. 3, p. 510 - 523, 2018.

GALINDO, F. S. *et al.* Produção de trigo no Cerrado afetada pela adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, p.794 - 805, 2017.

GANS, W; HERBST, F; MERBACH, W. Nitrogen balance in the system plant-soil after urea fertilization combined with urease inhibitors. **Plant Soil Environment**, Praha, v. 52, p. 36 - 38, 2006.

GERHARDT, E. C. M. **Regulação Pós-Traducional da Enzima Nitrogenase em *Azospirillum brasilense***. Orientador: Luciano Fernandes Huergo. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GUIMARÃES, L. J. M. **Caracterização de genótipos de milho desenvolvidos sob estresse de nitrogênio e herança da eficiência do uso deste nutriente**. Orientador: Cosme Damião da Cruz. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Planta) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

GUNARTO, L; ADACHI, K; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. From a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, p. 129 - 136, 1999.

HALL, P.G; KRIEG N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.433 - 435, 1984.

HUNGRIA, M. *et al.* A inoculação com cepas selecionadas de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* melhora a produção de milho e trigo no Brasil. **Plant and soil**, v. 331, p. 413 - 425, 2010.

HUNGRIA, M; NOGUEIRA, M. A; ARAÚJO, R. S. Inoculação de *Brachiaria* spp. Com a bactéria promotora de crescimento de plantas *Azospirillum brasilense*: Um componente

ecológico na recuperação de pastagens degradadas nos trópicos. **Agricultura Ecosystemas e Meio Ambiente**, v.221, p.125 - 131, 2016.

IFA-International Fertilizer Industry Association. Database. Disponível: <http://www.fertilizer.org/>. Acesso em: 17 Set 2020.

JADOSKI, C. J. *et al.* Physiological Assessments of Sweet Sorghum Inoculated with *Azospirillum brasilense* according to Nitrogen Fertilization and Plant Growth Regulators. **International Journal of Environmental; Agriculture Research**, Bikaner, v. 2, p. 45 - 54, 2016.

JUAREZ LAGUNES, F. I. *et al.* Avaliação de gramíneas tropicais para produção de leite por vacas de dupla finalidade no México tropical. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2136 - 2145, 1999.

KIM, Y. C. *et al.* Valorização do erance planta seca tol- por micróbios. Em: Aroca R (ed) respostas das plantas ao stress de seca: a partir morfológica para características moleculares. **Springer Verlag**, Berlin, p. 383 - 413, 2012.

LANNA, A. C. *et al.* Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1933 - 1939, 2010.

LARA CABEZAS, W. A. R. *et al.* Balanço nitrogenado da adubação sólida e fluida de cobertura na cultura de milho em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 363 - 376, 2000.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

MARCAS, B. B. *et al.* Promoção de crescimento Milho por inoculação com *Azospirillum brasilense* e metabólitos de *Rhizobium tropici* CIAT 899 enriquecido em tooligossacarides lipo-qui (Lcos). **AMB Expresso**, v. 5, p.71, 2015.

MARTHA JÚNIOR, G. B; CORSI, M. Fertilização nitrogenada na produção de leite. **Revista Balde Branco**, v. 36, p. 38 - 43, 2000.

MOREIRA, M. Emprego de Técnicas moleculares na taxonomia um e em Estudos sobre ecologia e Diversidade de Fungos micorrízicos arbusculares. *In*: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; **Microbiota do Solo ambiental e Qualidade**: Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2007.

NOVOA, R; LOOMIS, R. S. Nitrogen and Plant Production *In*: **Plant and Soil**, 1981. v. 58, p.177 - 204.

OKON, Y. *et al.* Aplicações agronômicas e de *Azospirillum* outro PGPR. Em: de Brujin FJ (ed) fixação de azoto biológico. **Wiley Hoboken**, 2015.

OKUMURA, R. S. *et al.* Nutrição nitrogenada no milho fertilizado com ureia tratada com inibidor de urease. **Sem. Ci. Agric.** v. 34, p.157 - 170, 2013.

- OKUMURA, R. S. *et al.* Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food, Agriculture; Environment**, v. 9, p. 510 - 514, 2011.
- PAVÃO, A.R; FERREIRA- FILHO, J.B.S. Impactos Econômicos da Introdução do Milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **RESR**, v.49, p. 81 - 108, 2011.
- PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: **fértil idéia**. **Ciencia hoje**, v.6, p.12 - 13, 1987.
- PEREG, G; LUZ, E; BASÃ, Y. Avaliação da afinidade e especificidade de *Azospirillum* para plantas. **Solo planta**, v. 399, p.389 - 414, 2016.
- PEREIRA, L. D. M. **Qualidade de sementes, teor de nitrogênio e expressão gênica em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense***. Orientador: Gustavo Vitti Môro. 2014. 69 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), faculdade de ciências agrárias e veterinárias- UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo. 2014.
- PRAKAMHANG, J. *et al.* The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated Rice (*Oryza sativa* L.) **Applied Soil Ecology**, Ireland, v. 42, p.141 - 149, 2009.
- PRANDO, A. M. *et al.* Características produtivas do trigo de acordo com fontes e níveis de nitrogênio. **Pesq Agropec Trop**. v. 43, p. 34 - 41, 2013.
- RAWLUK, C. D. L; GRANT, C. A; RACZ, G. J. Ammonia volatilization from soils fertilized with urea and varying rates of urease inhibitor NBPT. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 81, p. 239 - 246, 2001.
- REIS JUNIOR, F. B.*et al.* Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139 - 1146, 2008.
- REIS, V. M; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação Biológica do Nitrogênio – Estado da Arte. P. **Processos Biológicos no Sistema Solo-planta**. Embrapa Agrobiologia, Brasília-DF, Embrapa informações tecnológicas, 368p. 2005
- REIS, V. M. *et al.* Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 227 - 247, 2000.
- RODRIGUES, L.S. *et al.* Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41. n. 2. p. 275 - 284, 2006.
- SÁ, J. C. M. *et al.* Agricultura de baixo carbono na América do Sul para mitigar a mudança climática global e segurança antecedência alimentos. **Environ Int**, v. 98, p.102 -112, 2017.
- SAHOO, R. K. *et al.* Notypic Phe- e caracterização molecular de estirpes nativas *Azospirillum* de campos de arroz para melhorar a produtividade da cultura. **Protoplasma**, v. 251, p. 943 - 953, 2014.

SANTOS, L. R. P. M; AMARAL, H. F; NUNES, M. P. Desenvolvimento e assimilação de nutrientes de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio e fósforo. **Revista Terra; Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 34, p. 140 - 159, 2018.

SCIVITTARO, W. B. *et al.* Nitrogen losses by ammonia volatilization and lowland rice response to NBPT urease inhibitor-treated urea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1283 - 1289, 2010.

SOARES, J. R. **Efeito de Inibidores de Urease e de Nitrificação na Volatilização de NH₃ Pela Aplicação Superficial de Ureia no Solo.** Orientador: Heitor Cantarella. **2011. 76 f** Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agrônomo, Campinas - São Paulo, 2011.

SOUZA, E. M. D. *et al.* Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield? **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, p. 53 - 59, 2019.

SPAEPEN, S. J; VANDERLEYDEN. Sinalização auxina em *Azospirillum brasilense*: uma análise do proteoma. *In:* De Bruijn F. J. **fixação de azoto biológico**, 2015.

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

STRZELCZYK, E; KAMPERT, H; LI, C. Y. substâncias citocinina-like e produção de etileno por *Azospirillum* em meios com diferentes fontes bon carro-. **Microbiol Res**. v.149, p. 55 - 60, 1994.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TARRAND, J. J; KRIEG, N. R; DÖBEREINER, J. Um estudo taxonômico do grupo lipoferum Spirillum, com as descrições de um novo gênero, *Azospirillum* gen. e duas espécies *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) pente. *Azospirillum brasilense* sp. **Pode J Microbiol** v. 24, p. 967 - 980, 1978.

TASCA, F. A. *et al.* Volatilização de amônia do solo após aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.493 - 502, 2011.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M. *et al.* Adubação nitrogenada de trigo sob plantio direto no cerrado brasileiro de baixa altitude. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p.1732 - 1748, 2014.

TEUTSCH, C. D; FIKE, J. H; TILSON, W. M. Rendimento, digestibilidade e valor nutritivo do capim-braquiária, impactados pela taxa e fonte de fertilização nitrogenada. **Revista de Agronomia**, v. 97, p.1640 - 1646, 2005.

TIEN, T. M; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. substâncias de crescimento das plantas produzidas por *Azospirillum brasilense* e o seu efeito sobre o crescimento de Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl Environ Microbiol**, v. 37, p.1016 - 1024, 1979.

TORTORA, M. L. *et al.* Azospirillum brasilense sidero- com actividade antifúngica contra *Colletotrichum acutatum*. Arch. **Microbiol**, v.193, p. 275 - 286, 2011.

TRENKEL, M. E. Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. **International Fertilizer Industry Association**, Paris, p. 151, 1997.

TURAN, H. *et al.* Rendimento promoção e solubilização de fósforo pela planta rizobabactérias de promoção do crescimento em grande produção de trigo na Turquia. **J Nutr Planta do solo Sci**, v.175, p. 818 - 826, 2012.

VETTORAZZI, J. *et al.* Does the Nitrogen Rates, Methods and Times of Application Influences the Corn Nutrition and Yield, **Journal of Agricultural Science**, v. 11, 2019.

WATSON, C. J. Urease activity and inhibition - principles and practice. London: **The International Fertilizer Society**, p.40, 2000.

WATSON, C. J. *et al.* Soil properties and the ability of the urease inhibitor N- (n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. **Soil Biology; Biochemistry**, v. 26, p. 1165 - 1171, 1994.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. bactérias da rizosfera ajudar as plantas tolerarem estresse abiótico. **Trends Plant Sci**, v.14, p. 1 - 4, 2009.

2 FONTES E DOSES DE NITROGÊNIO ASSOCIADO À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DO MILHO NA AMAZÔNIA BRASILEIRA*

Juscelino Gonçalves Palheta¹, Ricardo Shigueru Okumura², Gerson Diego Pamplona Albuquerque², Diana Jhulia Palheta de Sousa², Jessica Suellen Silva Teixeira², Myriam Galvão Neves², Wagner Romulo Lima Lopes Filho², Luma Castro de Souza² and Cândido Ferreira de Oliveira Neto²

¹Institute of Agrarian Sciences, Laboratory of Biodiversity Studies of Upper Plants, Federal Rural University of Amazonia, Campus Belém, Pará, Brazil

²Federal Rural University of Amazonia, Campus Parauapebas, Pará, Brazil

³Federal Rural University of Amazonia, Campus Belém, Pará, Brazil

*Recebido em 06 abril 2021, aceito em 25 maio de 2021; publicado em 10 de julho de 2021, na Revista International Journal of Agriculture & Biology

Resumo

Informações dos benefícios das bactérias promotoras de crescimento, associado com fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada no milho e os efeitos na redução da quantidade de N utilizado são escassos na região amazônica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento vegetativo e as trocas gasosas de híbrido de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado com fontes e doses de nitrogênio. O delineamento experimental efetuado foi em blocos casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 x 2, assim especificado: quatro doses de N (0; 60; 120 e 180 kg ha⁻¹ de N), duas fontes de N (ureia comum e ureia tratada com inibidor de urease – NBPT) e ausência e presença de inoculação com *Azospirillum brasilense*, com quatro repetições cada. As avaliações constaram do crescimento vegetativo da planta (altura da planta, diâmetro do colmo, área foliar, número de folhas, massa seca do colmo, da raiz, das folhas, da parte aérea e massa seca total) e da fotossíntese, condutância estomática, transpiração, carbono interno, relação entre carbono interno e externo e teor de pigmentos cloroplastídicos. O uso de N proporcionou melhoria no crescimento vegetal da planta, sendo que a dose de 180 kg ha⁻¹ de N associado com *Azospirillum brasilense* promoveu aumento no diâmetro do colmo, fotossíntese, condutância estomática, transpiração e razão carbono interno/carbono externo do milho. O tratamento com inibidor de urease – NBPT – promoveu o maior diâmetro de colmo, transpiração, relação Ci/Ca e clorofila a, clorofila b, clorofila total e antocianina, quando comparado a ureia. A inoculação das sementes de milho com a bactéria e o uso da adubação nitrogenada, independentemente da fonte, promoveu melhoria no crescimento vegetativo do híbrido e favoreceu as respostas fisiológicas do milho, especialmente quando aplicada a dose de 180 kg ha⁻¹ de N.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento; Adubação nitrogenada; Fotossíntese; Inibidor de urease

Abstract

There is a lack of information on the benefits of growth-promoting bacteria associated with enhanced-efficiency nitrogen fertilizers in corn, and the effects on reducing the amount of N used in the Amazon region. Thus, the objective of the study was to evaluate the vegetative growth and gas exchange of corn inoculated with *Azospirillum brasilense* associated with sources and doses of nitrogen. The experimental design adopted was the completely randomized, in a 4 x 2 x 2 factorial scheme, in the following way: four doses of N (0; 60; 120 and 180 kg ha⁻¹ of N), two sources of N (common urea and urease inhibitor-treated urea – NBPT) and absence and presence of inoculation with *Azospirillum brasilense*, with four replications. The evaluations consisted of the vegetative growth of the plant (plant height, stem diameter, leaf area, number of leaves, dry mass of stem, root, leaves and aerial part and total dry mass) and photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, internal carbon, relationship between internal and external carbon and content of chloroplast pigments. The application of N provided an improvement in plant growth, and, in general, the dose of 180 kg ha⁻¹ N associated with *Azospirillum brasilense*, promoted an increase in stem diameter, photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and corn internal/external carbon ratio. The treatment with urease inhibitor – NBPT, promoted the largest stem diameter, transpiration, Ci / Ca ratio and chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll total and anthocyanin compared to urea treatment. The inoculation of corn seeds with the bacteria and the use of nitrogen fertilization, regardless of the source, promoted an improvement in the vegetative growth of the hybrid and favored the physiological responses of corn, especially when applied to a dose of 180 kg ha⁻¹ of N.

Keywords: Growth promoting bacteria; Nitrogen fertilization; Photosynthesis; Urease inhibitor.

2.1 Introdução

O milho (*Zea mays L.*) é uma planta pertencente à família Poaceae e tem ampla importância econômica no cenário agrícola, em razão dos seus grãos estarem associados à utilização para produção de alimentação animal, humana, espessantes, colantes e produção de óleos. O Brasil é o terceiro produtor mundial, perdendo para os Estados Unidos e China, e o segundo maior exportador do grão (Conab, 2019). No entanto, para obter altas produtividades é preciso altas doses de nitrogênio (N), já que geralmente os solos localizados em regiões tropicais não têm suprimento adequado para satisfazer a necessidade da cultura (Galindo *et al.* 2016), tornando a fertilização de N um dos mais onerosos no processo de produção (Souza *et al.* 2019).

O uso indiscriminado de fertilizante mineral pode afetar negativamente a fertilidade do solo, e originar problemas ambientais, tais como acidificação do solo, poluição ambiental e redução da atividade microbiana, assim, as bactérias promotoras de crescimento de plantas como *Azospirillum brasilense* surgem como alternativa para reduzir o custo de produção e favorecer a sustentabilidade agrícola (Vijayalakshmi *et al.* 2019).

O nitrogênio é fundamental para o metabolismo das plantas, contribuindo ativamente para a formação dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, amidas e coenzimas (Munareto *et al.* 2018), é um nutriente absorvido em grande quantidade pelo milho, sendo o mais limitante na produção, já que exerce funções nos componentes das células vegetais e envolvido no incremento da produtividade de grãos (Galindo *et al.* 2019).

Portanto, existe a necessidade de estudos que potencializem a melhoria da eficiência na utilização de nitrogênio, objetivando uma produção mais sustentável. Uma alternativa é o uso de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, devido à capacidade de reduzir a utilização de fertilizantes minerais, melhorando a atividades de microrganismo do solo e potencializando o crescimento do sistema radicular das plantas (Vogel e Fey 2016). As bactérias quando associadas à rizosfera proporcionam a fixação biológica do N, pelo meio da fragmentação da molécula de N₂ livre no solo, tornando-o assimilável para as plantas (Galindo *et al.* 2019), além do mais, essa bactéria possui a capacidade de aumentar a absorção de fósforo, nitrogênio e micronutrientes, melhorando a absorção de água, além disso, promove a secreção de hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (Margar e Dawson 2017).

Apesar dos benefícios oriundos da inoculação com *Azospirillum brasilense*, o microrganismo não consegue fornecer toda exigência de N do milho, requerendo complementação com aplicação de fertilizantes nitrogenados, sendo a ureia a principal fonte de N utilizada na agricultura mundial (IFA, 2019), tendo como vantagem elevada concentração de

nitrogênio (N), alta solubilidade, predisposição de mistura com outras fontes e menor custo de N. No entanto, apresenta altas perdas por volatilização de amônia (NH₃), especialmente em países de regiões tropicais, onde há predomínio de altas temperaturas como no Brasil (Frazão *et al.* 2014).

Uma das possibilidades para atenuar as perdas do N é o tratamento da ureia com substâncias que inibem a atividade da enzima urease, os chamados tiofosfatos de N-butil triamida (NBPT). A adição deste inibidor à ureia tem diminuído a volatilização de amônia em torno de 60%, aumentando a capacidade de uso do N e a produtividade do milho (Cantarella *et al.* 2008). Contudo, faltam estudos para definir a dose necessária de N em combinação com *Azospirillum spp.* para obter o máximo rendimento do milho, sendo fundamental determinar o potencial do uso da bactéria em combinação com NBPT, avaliando o benefício da aplicação de N na produtividade da cultura (Galindo *et al.* 2019). Diante disso, a hipótese do trabalho é que a inoculação com *Azospirillum brasilense* aliada às fontes e doses de nitrogênio melhoram o comportamento fisiológico de híbrido de milho. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o crescimento vegetativo e as trocas gasosas do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado com fontes e doses de nitrogênio.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Caracterização da área e análise de solo

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil. Apresentando como coordenadas geográficas 48°26'18.0" de longitude Oeste de Greenwich e 1°27'17.3" S de latitude Sul. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Af_i, com precipitação média de pelo menos 60 mm nos meses que menos chove, sem apresentar período de estiagem. O substrato utilizado no experimento foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm em Latossolo Amarelo distrófico (Embrapa, 2018), coletado em área de capoeira aberta da Universidade Federal Rural da Amazônia. Em seguida, foram retiradas amostras compostas para análise física e química do solo, no instituto brasileiro de análises (IBRA), conforme metodologia descrita por (Silva, 1999). Na Tabela 1 os resultados demonstraram a necessidade da correção de apenas o teor de potássio com aplicação de 60 kg ha⁻¹ com cloreto de potássio, seguindo recomendação de Oliveira *et al.* (2018). Os dados climáticos da área experimental foram coletados durante a condução do experimento (Fig. 1).

2.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o de bloco inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x 2x 2, assim especificado: quatro doses de N (0; 60; 120 e 180 kg ha⁻¹ de N), duas fontes de N, ureia comum (com 45% de N) e ureia tratada com inibidor de urease – NBPT (com 45% de N) na presença e ausência de *Azospirillum brasilense*, com quatro repetições cada.

2.2.3 Origem e semeadura das sementes

A semente utilizada foi o híbrido simples de milho K9960 VIP3 (classificado como alto potencial produtivo, ótima sanidade de colmo, elevada adaptabilidade de plantio para regiões tropicais / subtropicais e ciclo precoce), comumente adotado na região sudeste do Estado do Pará, doado pela empresa Juparanã. Inicialmente após a coleta o substrato foi passado em peneira de malha de 2 mm, em seguida foi homogeneizado em 256 kg de matéria (húmus) oriundo de resíduos de poda de mangueira para 768 kg de solo da mistura. Os vasos com dimensão de 25 x 32 cm de diâmetro e altura respectivamente, com volume de 15.708 cm³, foram preenchidos com 15,7 litros de substrato, preparado por meio da mistura homogênea de terriço com húmus, na proporção de 3:1 respectivamente.

2.2.4 Aplicação dos tratamentos

Para os tratamentos com inoculação, as sementes foram homogeneizadas juntamente com o inoculante (200 mL diluído em água equivalente a 10% do peso das sementes, estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração 2×10^8 UFC mL⁻¹), inoculadas uma hora antes da semeadura (Leite *et al.* 2019). As doses de nitrogênio foram aplicadas em cobertura de uma única vez, realizadas aos 10 DAE (dias após a emergência das plantas) quando começou a desenvolver o seu sistema de raiz secundário seguindo recomendação de Jadoski *et al.* (2016). Os baldes receberam irrigação diária controlada, para repor a água evapotranspirada durante o período experimental, e o teor de água do solo foi mantido próximo à capacidade de campo, por meio do método gravimétrico (Catuchi *et al.* 2011), que consiste na reposição da lâmina de irrigação baseada na pesagem diária dos baldes. O controle de plantas daninhas e pragas foi realizado diariamente e manualmente por meio do arranque mecânico e catação manual, respectivamente.

2.2.5 Fenologia e medição de plantas

As avaliações foram realizadas por ocasião do pleno florescimento masculino (estádio fenológico Vt), isto é, do pendoamento das plantas (Ritchie et al. 1993), aos 50 dias após a emergência (período que estabilizou o crescimento da parte aérea), mensurando as variáveis de crescimento vegetativo e trocas gasosas.

As medidas referentes à altura da planta (AP) e diâmetro do colmo (DC) foram efetuadas com auxílio de régua graduada e paquímetro digital marca Zaas, respectivamente; em seguida, as plantas foram seccionadas em diferentes partes (folhas, raiz, colmo + bainha), acondicionadas em sacos de papel de 5 kg, identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 2 °C. Ao atingir o peso constante, cada parte da planta foi pesada em uma balança analítica modelo M214AIH para determinação da massa seca da raiz (MSR), massa seca da folha (MSF), massa seca do colmo (MSC), massa seca da parte aérea MSPA (calculado como a soma das massas secas do colmo e folhas) e massa seca total (MST). O número de folhas (NF) foi obtido por meio da contagem manual, considerando todas as folhas completamente expandidas. Na determinação da área foliar (AF) foram mensurados o comprimento (C) e a largura (L), na parte mediana de todas as folhas de cada uma das plantas, para a obtenção inicial da AF segundo Sangoi *et al.* (2007). Adotando a proposta de Francis *et al.* (1969), o cálculo da área foliar foi obtido mediante ao emprego da seguinte equação: $AF (dm^2) = 0,75 * Largura * comprimento$ da folha, posteriormente, foram somados os valores individuais de todas as folhas para obter o valor total de área foliar por planta.

2.2.6 Avaliação das trocas gasosas

As trocas gasosas foram determinadas na folha intermediária completamente expandida e fotossinteticamente ativa, em duas folhas adjacentes, em dia sem nebulosidade, representando o período diurno em que a fotossíntese atinge os valores máximos, de acordo com que foi determinado a partir das curvas diurnas das trocas foliares. A taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática ao vapor d'água (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) e taxa de transpiração foliar (*E*) foram medidos no intervalo de 08:00 às 10:30 h na máxima fotossíntese da curva diurna, usando um sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas modelo (LI-6400-02B, LI-COR Inc., Lincoln, NE), sob uma concentração de CO₂ externo de 400 μmol mol⁻¹ de ar e sob um fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de 900 μmol m⁻² s⁻¹ de fótons. Posteriormente, foi calculada a relação carbono interno e externo (*C_i/C_a*).

2.2.7 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Inicialmente foi realizada a pesagem de 100 mg de folha fresca de cada amostra, colocando em um almofariz, contendo 3mL de acetona a 80%, seguida da maceração e a filtração com papel toalha. Transferindo o sobrenadante para um balão volumétrico, aferindo o volume para 25 ml. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro à 663nm (clorofila a), 647 nm (clorofila b), 537 nm (antocianinas) e 470 nm (carotenoides) e como o branco usou-se somente acetona 80%, sendo que as concentrações finais de clorofilas, antocianinas e carotenoides foram calculadas segundo metodologia preconizada por Sims e Gamon (2002).

2.2.8 Análise estatística

Os resultados das análises de crescimento e trocas gasosas foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para verificar a normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente. Cumpridas as premissas básicas, foi realizada a análise de variância, na qual foi realizado o desdobramento, que se mostrou significativo. Para avaliar o efeito de diferentes doses de N, fertilizantes e inoculação no híbrido de milho, foi realizada análise de variância, com Teste de Tukey a 5% de probabilidade, e ajustado por regressão polinomial para diferenciar se houve resposta linear ou não linear às taxas de N aplicadas, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira 2019).

2.3 Resultados

Pelos resultados da análise de variância (Tabelas 2 e 3) verificou-se efeito significativo pelo teste F ($p < 0,05$) das fontes de nitrogênio, inoculação com *Azospirillum brasilense* e das doses de nitrogênio, no crescimento e nas características fisiológicas avaliadas, exceto a concentração interna de carbono. O efeito significativo na interação tripla (Fonte x Inoculação x Doses) foi observado para o diâmetro do colmo, clorofila b, clorofila total e antocianina, indicando dependência dos fatores avaliados.

2.3.1 Crescimento da planta e rendimento de biomassa

Para o diâmetro do colmo (DC) verificou-se efeito significativo da interação tripla (Fonte x Inoculação x Dose) (Tabela 2). O DC nas plantas de milho com aplicação de ureia sem

inoculação resultou em resposta quadrática para as doses de nitrogênio, com o maior valor de 17,22 mm obtido na dose de 149,7 kg ha⁻¹ de N. Enquanto os tratamentos relacionados à ureia com *Azospirillum brasilense* e inibidor de urease na ausência e presença da bactéria obtiveram ajustes para a equação linear crescente, em que a dose de 180 kg ha⁻¹ de N promoveu os valores máximos de 17,26, 17,05 e 17,44 mm de diâmetro, respectivamente. A inoculação do milho com a bactéria promoveu maior incremento no diâmetro do colmo quando comparado com as plantas sem a inoculação (Tabela 4).

A altura da planta (AP) e área foliar (AF) apresentaram efeito significativo para o fator Dose, com o melhor ajuste para a equação quadrática (Tabela 2). O aumento nas doses de N influenciou positivamente os valores fitotécnicos da cultura. Observou-se também neste estudo que as doses de 152,11 e 157,75 kg ha⁻¹ de N foram as que proporcionaram as maiores AP (122,50 cm) e AF (43,61 dm²), respectivamente (Tabela 5).

Para a variável número de folhas (NF) observou-se efeito significativo na interação Inoculação x Dose, ajustando-se ao modelo de regressão quadrática (Tabela 2). Pelas informações da Tabela 6 verificou-se que o número de folhas para plantas sem inoculação alcançou valor máximo de 14,22 plantas⁻¹ na dose estimada de 180 kg ha⁻¹ de N, enquanto para as plantas com inoculação o número de folhas atingiu valor de 13,72 plantas⁻¹ na dose de 131,25 kg ha⁻¹ de N.

A massa seca das folhas (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST) apresentaram efeito para a interação Inoculação x Dose (Tabela 2). Os tratamentos com ureia na ausência e presença de *Azospirillum brasilense* adequaram-se melhor ao modelo de regressão quadrática, em que a variável MSF obteve o valor de 27,03 g planta⁻¹ na dose 182,37 kg ha⁻¹ de N e 25,57 g planta⁻¹ na dose estimada de 148,37 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 6).

Para a MSPA verificou-se valores máximos de 73,56 e 68,89 g planta⁻¹ nas doses de 177,73 e 158,41 kg ha⁻¹ de N com a fonte ureia na ausência e presença de *Azospirillum brasilense*, respectivamente. Enquanto os maiores valores de MST de 89,08 e 83,12 g planta⁻¹ foram obtidos nas doses de 186,89 e 159,28 kg ha⁻¹ de N com ureia na ausência e presença da bactéria, respectivamente (Tabela 6). As variáveis de massa seca do colmo (MSC) e massa seca da raiz (MSR) apresentaram efeito significativo para o fator dose, com o melhor ajuste dos dados à equação quadrática, em que as doses de 169,68 e 158,50 kg ha⁻¹ de N proporcionaram os maiores valores de 41,85 e 13,28 g planta⁻¹, respectivamente (Tabela 5).

2.3.2 Trocas gasosas

2.3.2.1 Taxa de assimilação líquida da fotossíntese (A): A análise de variância identificou efeito significativo ($p < 0,05$) dos fatores isolados Inoculação e Dose para a taxa de assimilação líquida da fotossíntese (A), com ajuste ao modelo de regressão linear crescente (Tabela 3). A aplicação em cobertura de nitrogênio na ausência da bactéria promoveu valores que variaram de 13,07 a 18,23 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto no milho inoculado com a bactéria os valores foram de 16,00 a 19,85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas doses zero a 180 kg ha^{-1} de N, respectivamente (Tabela 6).

2.3.2.2 Condutância estomáticas (gs): Este atributo teve um efeito significativo para os fatores isolados Inoculação e Dose (Tabela 3), ajustando ao modelo de regressão linear, nas quais o aumento das doses promoveu melhoria na condutância, variando de 0,126 para 0,156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas de milho com ausência de inoculação e 0,142 a 0,158 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas com presença de *Azospirillum* na dose de 0 e 180 kg ha^{-1} de N respectivamente (Tabela 6). No fator Dose observou-se ajuste ao modelo de regressão linear, onde o aumento das doses favoreceu a condutância estomática, em que os valores variaram de 0,13 a 0,15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de zero a 180 kg ha^{-1} de N respectivamente (Tabela 5).

2.3.2.3 Transpiração (E): Os dados experimentais da transpiração foram submetidos a análise de variância, verificando efeito na interação Fonte x Inoculação e Fonte x Dose (Tabela 3). Pelo desdobramento da interação Fonte x Inoculação verificou-se que a ureia na presença da bactéria apresentou média de 3,48 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguida por inibidor de urease na ausência (3,27 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e presença de *Azospirillum* (3,23 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), enquanto a ureia sem inoculação resultou no valor de 2,85 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de transpiração (Tabela 7). Para a interação Fonte x Dose os resultados não se ajustaram a nenhum modelo estatístico, com média de 2,97 e 3,20 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para planta de milho com ureia e 3,09 e 3,62 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com inibidor de urease na dose de 0 e 180 kg ha^{-1} de N, respectivamente (Tabela 8).

2.3.2.4 Relação carbono interno e externo (Ci/Ca): Na relação carbono interno e externo (Ci/Ca), a análise de variância apresentou efeito significativo nos fatores isolados Fonte e Dose (Tabela 3). Quando adubado com ureia, verificou-se que os resultados não se ajustaram a nenhum modelo matemático, com média de 0,47 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, no caso do inibidor de urease verificou-se efeito quadrático sendo que o menor valor para essa característica foi de 0,47 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ na dose estimado de 85,71 kg ha^{-1} de N, em seguida apresentando crescimento até a dose máxima (Tabela 8).

2.3.2.5 Pigmentos fotossintéticos

A análise de variância para o conteúdo de clorofilas a (Chl a) observou as interações significativas para os fatores Fonte x Inoculação e Fonte x Dose (Tabela 3). O desdobramento da interação Fonte x Inoculação apresentou que os tratamentos ureia com *Azospirillum* e inibidor de urease na ausência e presença da bactéria foram iguais estatisticamente, diferindo apenas do tratamento ureia sem inoculação, sendo os valores obtidos de 0,0021, 0,0025, 0,0021 e 0,0016 mmol kg⁻¹ MF, respectivamente (Tabela 7). A partir do desdobramento da interação Fonte x Dose, verificou-se que a aplicação da fonte de N com inibidor de urease resultaram no melhor ajuste da equação quadrática, com o máximo valor de 0,003 mmol kg⁻¹ MF obtido na dose de 125 kg ha⁻¹ de N. Enquanto a utilização da fonte ureia não apresentou ajuste a nenhum modelo matemático, com média de 0,002 mmol kg⁻¹ MF (Tabela 8).

Para as variáveis clorofilas b (Chl b), clorofilas totais (Chl totais) e antocianina verificaram pela análise de variância interação da Fonte x Inoculação x Dose (Tabela 3). A Chl b apresentou o melhor ajuste ao modelo quadrático, em que a adubação com ureia com ausência e presença da inoculação da bactéria atingiu o valor máximo de 0,00161 e 0,0009 mmol kg⁻¹ MF nas doses estimadas de 65,16 e 71,42 kg ha⁻¹ de N, respectivamente, enquanto a aplicação da fonte com inibidor de urease na ausência e presença de *Azospirillum* promoveu o valor de 0,00170 e 0,00200 mmol kg⁻¹ MF na dose estimada de 100 kg ha⁻¹ de N. A concentração de clorofila total teve ajuste ao modelo quadrático, verificando que a aplicação de ureia com ausência e presença de *Azospirillum* resultou no teor máximo de 0,00363 e 0,0026 mmol kg⁻¹ MF na dose estimada de 75 kg ha⁻¹ de N. Já a utilização do inibidor de urease na ausência e presença da bactéria obteve o valor máximo de 0,00460 e 0,00563 mmol kg⁻¹ MF nas doses de 100 e 125 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 4).

No caso do teor de carotenoides observou-se pela análise de variância efeito significativo da interação Inoculação x Dose e Fonte x Dose (Tabela 3), sendo que o tratamento relacionado ao adubo nitrogenado com ausência do *Azospirillum brasilense* ajustou-se ao modelo de regressão quadrática, sendo estimada a concentração máxima de 0,001 mmol kg⁻¹ MF na dose de 64,2 kg ha⁻¹ de N (Tabela 6), já as plantas cultivada no solo adubado com N inoculada com a bactéria houve uma resposta linear decrescente, onde o aumento da adubação nitrogenada promoveu uma diminuição na concentração de carotenoides por planta, neste caso, atingindo valor de 0,002 mmol kg⁻¹ MF na dose zero de N. Para a interação Fonte x Dose apresentou o melhor ajuste ao modelo quadrático, com o maior valor de 0,0016 e 0,0011 mmol kg⁻¹ MF

obtido nas doses de 50 e 100 kg ha⁻¹ de N para as fontes ureia e inibidor de urease, respectivamente (Tabela 8).

2.4 Discussão

O efeito positivo da inoculação de semeadura de milho com *Azospirillum brasilense* pode estar associado à produção de hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e ácido indolacético, excretado pela bactéria, pois estes hormônios além de promover melhoria no processo de germinação das sementes estimulam o crescimento da planta por meio de alongamento celular (Vogel *et al.* 2019). Tendência similar foi descrita por Costa *et al.* (2015) e Marini *et al.* (2015), que verificaram maior diâmetro do colmo em milho inoculado com *Azospirillum* quando comparado a ausência da bactéria. O aumento da adubação nitrogenada, com ênfase para a dose de 180 kg ha⁻¹ de N, associado à presença de *A. brasilense*, promoveu maior incremento no diâmetro do colmo. O aumento do diâmetro do colmo no milho está associado ao incremento na produção, uma vez que possibilita a concentração de sólidos solúveis, onde posteriormente serão utilizados durante a fase de formação de grãos (Fancelli e Dourado Neto, 2000), principalmente em situação de estresse que comprometa a taxa de produção ou translocação de fotoassimilados (Dartora *et al.* 2013).

A adubação nitrogenada, na dose adequada, isto é, satisfazendo as exigências nutricionais das plantas, desempenha um papel fundamental no crescimento vegetativo, e assim na produção. A maior massa vegetativa nas plantas adubadas com nitrogênio e inoculadas com *A. brasilense* pode estar associada ao efeito benéfico do nitrogênio no metabolismo da planta, especialmente em alguns processos fisiológicos, favorecendo a fixação nitrogenada e o crescimento vegetal (Kordi *et al.* 2019 Morais *et al.* (2015) identificaram que aplicações das doses de 100 e 200 kg ha⁻¹ de N promoveram incremento em todos os atributos vegetativos do milho, justificando tal fato a importância do N para a cultura, sendo um macronutriente, responsável por compor moléculas de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas e os ácidos nucleicos.

Os resultados mostraram que a dose de 180 kg ha⁻¹ de N foi responsável pela maior concentração de matéria seca total no milho não inoculado com *Azospirillum brasilense*, em contrapartida, as plantas inoculadas com a bactéria alcançaram valores máximos em doses menores de N. Por ser o nitrogênio componente principal da molécula de clorofila, aminoácidos e proteínas possibilita a cultura crescer até atingir a maturidade completa (Marngar e Dawson 2017), assim, a maior disponibilidade de N promove acréscimo na biomassa seca do milho

(Bianchet *et al.* 2015). As pesquisas iniciais envolvendo inoculações entre plantas e *Azospirillum brasilense* relatavam que o benefício era essencialmente oriundo da fixação biológica de N₂, porém, em estudos posteriores houve identificação do efeito positivo nas alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas inoculadas (Okon e Vanderleyden, 1997; Dobbelaere *et al.* 2001), como por exemplo, liberação de hormônio de crescimento, aumento na absorção de água e nutrientes em plantas inoculadas (Reis *et al.* 2008).

A maior taxa de fotossíntese nas plantas com a bactéria pode ser atribuída ao processo de fixação de N e a função secretora de hormônio reguladora de crescimento (Kod *et al.* 2017). Saikia *et al.* (2007) e Barassi *et al.* (2008) afirmaram que plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* apresentaram melhoria nos parâmetros fotossintéticos das folhas. Para o fator Dose verificou-se que a atividade da A foi crescente e linear, variando de 14,53 a 19,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas doses zero (controle) a 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 5). As crescentes doses de nitrogênio podem ter favorecido o aumento da carboxilação, em virtude da necessidade da cadeia carbônicas para a assimilação do nitrato (Dos Anjos Soares *et al.* 2013), e considerando que o milho estava em pleno crescimento e desenvolvimento, exigindo maiores teores de carbono e nitrogênio, o aumento da disponibilidade de N possibilitou a elevação da carboxilação (Jadoski, *et al.* 2016). Além disso, a elevação da concentração de nitrogênio no solo pode ter favorecido a divisão e expansão celular, originando maior área fotossinteticamente ativa na folha do milho (Marngar e Dawson, 2017), por ser o N constituinte dos componentes do processo fotossintético, o aumento resulta no incremento da assimilação de carbono (Braz *et al.* 2019).

A melhor eficiência em relação à condutância estomática em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* pode estar relacionada à maior concentração de CO₂ nos espaços intercelulares e na taxa de transpiração foliar, tendência similar foi descrita Rodrigues *et al.* (2014) e Barassi *et al.* (2008). Para Jadoski *et al.* (2016) o aumento da condutância estomática em função do incremento de dose de N aplicada aos 46 DAE, pode estar relacionado a maior translocação dos fotossimilados promovido pelo aumento da fotossíntese, corroborando com os resultados deste trabalho.

Resultados revelaram valores da transpiração foliar aproximadamente constantes, independente dos fatores analisados (Tabelas 8), o que presumivelmente ocorreu em função da ausência de limitação hídrica durante o período experimental, uma vez que o ensaio foi mantido na capacidade de campo, portanto, as plantas de milho expressaram a demanda máxima de transpiração. Bulegon *et al.* (2016) relataram que na cultura da soja a planta expressa a capacidade máxima de transpiração em condições adequadas de água.

Taiz; Zeiger (2013) evidenciaram que a rubisco é uma enzima presente nas folhas, representando cerca de 40% do total das proteínas solúveis, portanto, a concentrações de dióxido de carbono nos espaços intercelulares, pode inferir um indicativo de mau funcionamento da enzima. Além disso, maior índice de assimilação líquida de CO₂ observada neste trabalho pode ser atribuído ao aumento das concentrações de dióxido de carbono nos espaços intercelulares em função do aumento das dosagens de N. Rodrigues (2014) atribui em seu trabalho que as maiores taxas de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática e transpiração foliar promoveram maior concentração de CO₂ nos espaços intercelulares. Farquhar e Sharkey (1982) ressaltam que o aumento na concentração de CO₂ no interior da câmara subestomática nem sempre proporciona elevação na taxa de assimilação líquida de CO₂ pela planta, sendo assim esse ponto definido como o de máxima eficiência de carboxilação. Jadoski *et al.* (2016) verificaram que o aumento da quantidade de carbono em plantas de milho ocorreu devido ao pleno crescimento e desenvolvimento do milho, e assim exigindo maiores taxas de CO₂ e nitrogênio para compensar a elevação da carboxilação.

O aumento nos teores de clorofila (Chl *a*, Chl *b* e Chl total) foi promovido pelo incremento no metabolismo do nitrogênio, por ser o nutriente componente fundamental nas plantas, participando ativamente, na biossíntese de proteínas e clorofilas, assim a aplicação de N eleva o teor de clorofila no milho (Morais *et al.* 2015). O excesso de N disponível à planta é prejudicial, verificando que na maior dose de N (180 kg ha⁻¹ de N) ocorreu redução de 33% nos teores de Chl *a* comparado à dose de 125 kg ha⁻¹ de N, possivelmente, devido ao direcionamento do N para a formação de massa seca das plantas, ocasionando a diluição na concentração do nutriente (Larrosa *et al.* 2009). Além disso, a diminuição da concentração de carotenoides com o aumento das doses de N identificada no presente estudo pode ter contribuído para redução da concentração de clorofilas, uma vez que os carotenoides nas folhas têm a função de proteger as clorofilas da degradação (Abdelgawad *et al.* 2015).

Segundo Dwyer *et al* (1995), o nitrogênio absorvido em demasia acumula-se como NO₃, e nessa forma o nitrogênio não se associa à molécula de clorofila, explicando em parte o decréscimo observado na concentração desse pigmento fotossintético (Takebe e Yoneyama 1989). Além disso, os decréscimos na concentração de clorofilas indicam uma redução da capacidade fotossintética do milho, estando relacionado à ação da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Taiz e Zeiger 2013).

2.5 Conclusão

A aplicação da ureia convencional foi mais eficiente em comparação ao fertilizante contendo inibidor de urease, além disso, a inoculação da semente de milho com *Azospirillum brasilense* e doses de N promovem melhoria na atividade fotossintética, condutância estomática e transpiração. De maneira geral, a dose de 180 kg ha⁻¹ de N proporcionou incrementos nas variáveis de crescimentos (AP, AF, DC, NF, MSF, MSPA, MST, MSC e MSR) e trocas gasosas (fotossíntese, condutância estomática e relação Ci/Ca). A dose de 120 kg ha⁻¹ de N associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu maior número de folhas, massa seca da folha, massa seca da parte aérea, massa seca total, além de melhora na fotossíntese e condutância estomática, sendo a mais eficiente em termo de produção vegetativa do híbrido de milho. Além disso, aplicação de fonte de N com inibidor de urease – NBPT resultou no incremento diâmetro de colmo, relação Ci/Ca, transpiração e clorofila a, comparado a fonte ureia.

2.6 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Amazônia de Apoio aos Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (FAPESPA), à Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Grupo de Estudos da Biodiversidade de Plantas Superiores (EBPS), pelo apoio financeiro e estrutural para a execução deste experimento.

2.7 Referências

- Abdelgawad H, ER Farfan-Vignolo, D De Vos, H Asard (2015). Elevated CO₂ mitigates drought and temperature induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Sci* 231:1–10
- Barassi CA, RJ Sueldo, CM Creus, LE Carrozzi, WM Casanovas, MA Pereyra (2008). Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: *Azospirillum sp.: Cell Physiology, Plant Interactions and Agronomic Research in Argentina*, pp:49–59. Cassán FD, I Garcia de Salamone (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Argentina
- Braz RDS, CFD Lacerda, RND Assis Júnior, JFDS Ferreira, ACD Oliveira, ADA Ribeiro (2019). Growth and physiology of maize under water salinity and nitrogen fertilization in two soils. *Rev Bras Engenharia Agríc Ambiental* 23:907–913.
- Bianchet PL, Sangoi, CAD Souza, O Klauberg Filho, F Panison (2015). Desenvolvimento vegetativo do arroz irrigado afetado pela inoculação com *Azospirillum* e aplicação de nitrogênio mineral. *Rev Fac Agron* 114:201–207.
- Bulegon LG, VF Guimarães, VA Egewarth, MG Santos, AL Heling, SD Ferreira, APGS Wengrat, AG Battistus (2016). Growth and gas exchange in the vegetative period of soy inoculated with bacteria diazotrophic. *Nativa* 4:277–286.
- Cantarella H, PCO Trivelin, TLM Contin, FLF Dias, R Rossetto, R Marcelino, RB Coimbra, JA Quaggio (2008). Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. *Sci Agric* 65:397–401.
- Cassán F, M Diaz-Zorita (2016). *Azospirillum sp.* in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol Biochem* 103:117–130.
- Catuchi TA, HF Vítolo, SC Bertolli, GM Souza (2011). Tolerance to water deficiency between two soybean cultivars: Transgenic versus conventional. *Ciência Rural* 31:373–378.
- Coêlho JD (2018). Produção de grãos: Feijão, milho e soja. *Cad Setorial Etene* 3:1–13
- Costa RRGF, GSF Quirino, DCF Naves, CB Santos, AFS Rocha (2015). Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesq Agropec Trop* 45:304–311.
- Dartora J, VF Guimaraes, D Marini, G Sander (2013). Nitrogen fertilization associated to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in the maize. *Rev Bras Eng Agric Ambiental* 17:1023–1029.
- De Oliveira IJ, J Fontes, J Barreto, J Pinheiro (2018). Recomendações técnicas para o cultivo de milho no Amazonas. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1096180/1/12018Final.pdf> (Accessed: 13 March 2020)

Dobbelaere S, A Croonenborghs, A Thys, D Ptacek, J Vanderleyden, P Dutto, C Labandera-Gonzalez, J Caballero-Mellado, JF Aguirre, Y Kapulnik, S Brener, S Burdman, D Kadouri, S Sarig, Y Okon (2001) response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* 28:871–879.

Dos Anjos Soares LA, GF Furtado, EMG Andrade, JRM Sousa, HOC Guerra, R Do Nascimento (2013). CO₂ exchange of cowpea under saline water and nitrogen fertilization. *Agropec Científica Semiárido* 9:30–37.

Dwyer LM, AM Anderson, BL Ma, DW Stewart, M Tollenaar E Gregorich (1995). Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. *Can J Plant Sci* 75:179–182.

Embrapa (2018). Sistema Brasileiro de Classificação de solos. *Revista e ampliada* 5^a edição pp:1–355. Embrapa, DF, Brasília.

Fancelli AL, D Dourado Neto (2000). *Produção de Milho*. Agropecuária, Guaíba, Brazil

Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 33:317–345.

Frazão JJ, AR da Silva, VL da Silva, VA Oliveira, RS Corrêa (2014). Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. *Rev Bras Engenharia Agríc Ambiental* 18:1262–1267.

Ferreira DF (2019). Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Rev Bras Biometria* 37:529–535.

Filippou P, P Bouchagier, E Skotti, V Fotopoulos (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environ Exp Bot* 97:1–10.

Galindo FS, MCM Teixeira Filho, S Buzetti, PH Pagliari, JMK Santini CJ Alves, MM Megda, TAR Nogueira, M Andreotti, O Arf (2019). Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. *Agron J* 111:1985–1997.

Galindo FS, MCM Teixeira Filho, S Buzetti, JMK Santini, CJ Alves, LM Nogueira, MGZ Ludkiewicz, M Andreotti, and JLM Bellotte (2016). Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev Bras Ciência Solo* 40:15–36.

Hungria M, RJ Campo, EM Souza, FO Pedrosa (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425.

IFA (2019) International Fertilizer Industry Association. *IFA database*. Available at: <http://www.fertilizer.org/>. (Accessed: 17 March 2019).

Jadoski CJ, JD Rodrigues, D De Oliveira, DO Guilherme, EO Ono, RR Marques, SO Jadoski (2016). Physiological assessments of sweet sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense*

according to nitrogen fertilization and plant growth regulators. *Intl J Environ Agric Res* 2:45–54.

Köppen W (1918). Klassifikation der klimare nach temperatur, Niederschlag und Jahreslauf. *Petermanns Geogr. Mitteilungen* 64:193–203.

Kordi S, F Ghanbari (2019). Evaluation of yield, yield components and some physiological and qualitative traits of corn affected by chemical and biological nitrogen fertilizers. *Acta Sci Polonorum-hortorum Cultus* 18:3–12.

Larrosa, E Marchesan, LS Da Silva, LA De Avila (2009). Nitrogen doses and timing on rice susceptibility to low temperature in reproductive stage. *Ciência Rural* 39:992–998.

Leite RC, AC Santos, JGD Santos, RC Leite, LBT Oliveira, M De Hungria (2019). Mitigation of Mombasa grass (*Megathyrus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev Bras Ciência do Solo* 43:1–14.

Marini D, VF Guimarães, J Dartora, MC Lana AS Pinto Júnior (2015). Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. *Rev Ceres* 62:117–123.

Marnagar E, J Dawson (2017). Effect of biofertilizers, levels of nitrogen and zinc on growth and yield of hybrid maize (*Zea mays* L.). *Intl J Curr Microbiol Appl Sci* 6:3614–362.

Masciarelli O, L Urbani, H Reinoso, V Luna (2013). Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *J Microbiol* 51:590–597.

Morais TP, CH Brito, AS Ferreira JMQ Luz (2015) Morphophysiological aspects of maize plants and soil biochemistry due to nitrogen fertilization and maize seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev Ceres* 62:507–514.

Munareto JD, TN Martin, TM Muller, UR Nunes, GB Rosa, LFT Grando (2018). Compatibility of *Azospirillum brasilense* with fungicide and insecticide and its effects on the physiological quality of wheat seeds. *Ciência agrícola* 39:855–864.

Okon Y, J Vanderleyden (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63:364–370.

Reis Júnior FB, CTT Machado, AT Machado, L Sodek (2008). Inoculation of *Azospirillum amazonense* into two maize genotypes under different N treatments. *Rev Bras Ciência Solo* 32:1139–1146.

Ritchie SW, JJ Hanway, GO Benson (1993). *How a Corn Plant Develops*. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa, USA.

Rodrigues LFOS, F Guimarães, MB Da Silva, JAS Pinto, J Klein, ACPR Da Costa (2014). Agronomic characteristics of wheat as a function of *Azospirillum brasilense*, humic acids and nitrogen in a greenhouse. *Rev Bras Engenharia Agríc Ambiental* 18:31–37.

Saikia SP, V Jain, K Sangeeta, A Samitha (2007). Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in corn. *Curr Sci* 93:1296–1300.

Sangoi L, A Schmitt, CG Zanin (2007). Área foliar e rendimento de grãos de híbridos de milho em diferentes populações de planta. *Rev Bras Milho Sorgo* 6:263–271.

Sims DA, JA Gamon (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens Environ* 81:337–354.

Silva FC (1999). *Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes*. Comunicação para Transferência de Tecnologia, 370. Embrapa, Brasília.

Souza EMFS, MCM Galindo, PRT Teixeira Filho, AC Silva, GC Santos, Fernandes (2019). Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield. *Rev Bras Engenharia Agríc Ambiental* 23:53–59.

Sangoi L, AC Berns, ML Almeida, CG Zanim, C Schweitzer (2007). Agronomic characteristics of wheat cultivars in response to the time of nitrogen cover fertilization. *Ciência Rural* 37:1564–1570.

Taiz L, Zeiger (2013). *Plant Physiology* 4th edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Takebe M, T Yoneyama (1989). Measurement of leaf colour scores and its implication to nitrogen nutrition of rice plants. *Jpn Agric Res J* 232:86–93.

Vijayalakshmi NR, M Swamy, Mahadeva (2019). Morphological and biochemical characterization of *Azospirillum* isolates from rhizoplane of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.]. *J Pharmacog Phytochem* 8:114–118.

Vogel GF, R Fey (2019). *Azospirillum brasilense* interaction effects with captan and thiodicarb on the initial growth of corn plants. *J Neotrop Agric* 6:53–59.

Vogel GF, R Fey (2016). Estímulo fazer potencial germinativo e fisiológico de centeio e triticale por *Azospirillum brasilense*, submetido ao tratamento químico de sementes. *Sci Agraria Paranaenses* 15:493–49

Tabela 1- Análises físicas e químicas do solo, antes da semeadura do milho

Prof (cm)	N-total kg ha ⁻¹	pH CaCl ₂	MO --g dm ⁻³ --	C	P mg dm ⁻³	K	Ca -----mmol _c dm ⁻³ -----	Mg	Al m%	H+Al -----mmol _c dm ⁻³ -----	SB
	4960	5,4	36	21	127,2	1,5	48	11	0	29	124
0-20	CTC mmol _c dm ⁻³	V %	Cu	Fe	Mn -----mg dm ⁻³ -----	Zn	B	S	Silte	Argila	Areia total
	153	68	1,6	37	36,3	52	0,59	16	99	136	765

Tabela 2- Resumo da análise de variância, aplicado no diâmetro do colmo (DC), altura da planta (AP), área foliar (AF), número de folha (NF), massa seca da folha (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), massa seca do colmo (MSC) e massa seca das raízes (MSR) em conformidade com a fonte (F) a inoculação de *Azospirillum brasilense* (I), e a dose de nitrogênio (D).

Causa de Variação	GL	Quadrados médios								
		DC	AP	AF	NF	MSF	MSPA	MST	MSC	MSR
Fonte (F)	1	0.070 ^{ns}	0.023 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.350 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.030 ^{ns}
Inoculação (I)	1	0.665 ^{ns}	0.023 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.450 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.009 ^{ns}
Dose (D)	3	6.672*	0.274*	0.001*	32.355*	0.155*	0.055*	0.036*	0.542*	0.189*
F x I	1	0.006 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.056 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.005 ^{ns}
F x D	3	0.255 ^{ns}	0.014 ^{ns}	0.001 ^{ns}	1.163 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.010 ^{ns}	0.005 ^{ns}
I x D	3	0.274 ^{ns}	0.027 ^{ns}	0.001 ^{ns}	4.916*	0.017*	0.004*	0.003*	0.028 ^{ns}	0.022 ^{ns}
F x I x D	3	0.605*	0.016 ^{ns}	0.001 ^{ns}	2.326 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.013 ^{ns}	0.009 ^{ns}
Blocos	3	0.504*	0.017 ^{ns}	0.001 ^{ns}	1.098 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.042*	0.008 ^{ns}
Resíduo	45	0.175	0.014	0.001	1.822	0.003	0.001	0.001	0.014	0.009
CV (%)	-	5.0	2.5	0.5	1.7	3.0	1.8	1.5	4.7	5.7

ns: não significativo, *: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, CV: coeficiente de variação.

Tabela 3- Resumo da análise de variância, aplicado na fotossíntese (*A*), carbono interno (*Ci*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), relação carbono interno e externo (*Ci/Ca*), clorofila a (*Chl a*), clorofila b (*Chl b*), Clorofila total (*Chl total*), antocianina e carotenoides (CAR) em conformidade com a fonte (F), a inoculação de *Azospirillum brasilense* (I), e a dose de nitrogênio (D).

Causa de variação	GL	Quadrados médios									
		<i>A</i>	<i>Ci</i>	<i>gs</i>	<i>E</i>	<i>Ci/Ca</i>	<i>Chl a</i>	<i>Chl b</i>	<i>Chl total</i>	<i>Antocianina</i>	CAR
Fonte (F)	1	0.003 ^{ns}	4544.4 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.081 ^{ns}	0.003*	17819.0*	6728.6*	29.6*	0.2 ^{ns}	663.9 ^{ns}
Inoculação (I)	1	0.202*	402.84 ^{ns}	10.72*	6.93*	0.001 ^{ns}	610.1 ^{ns}	14.3 ^{ns}	2.0 ^{ns}	0.9 ^{ns}	1012.9 ^{ns}
Dose (D)	3	0.244*	2439.7 ^{ns}	10.94*	1.01 ^{ns}	0.002*	9045.4*	6970.6*	21.4*	18.7*	10762.0*
F x I	1	0.006 ^{ns}	6807.1 ^{ns}	0.57 ^{ns}	7.37*	0.001 ^{ns}	17251.0*	11682.0*	1.0 ^{ns}	5.8*	420.5 ^{ns}
F x D	3	0.022 ^{ns}	385.01 ^{ns}	2.05 ^{ns}	6.65*	0.001 ^{ns}	9539.20*	7078.9*	30.9*	4.2*	10985.0*
I x D	3	0.020 ^{ns}	1222.6 ^{ns}	1.47 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.001 ^{ns}	2240.40 ^{ns}	3701.40*	10.6 ^{ns}	2.0 ^{ns}	2331.50*
F x I x D	3	0.015 ^{ns}	3107.5 ^{ns}	0.68 ^{ns}	0.83 ^{ns}	0.001 ^{ns}	8301.10 ^{ns}	3161.50*	22.0*	4.2*	462.0 ^{ns}
Blocos	3	0.101*	74001.0*	3.56 ^{ns}	14.47*	0.006*	1666.40 ^{ns}	590.5 ^{ns}	11.5 ^{ns}	2.3 ^{ns}	322.1 ^{ns}
Resíduo	45	0.024	3313.1	2.24	1.60	0.001	2973.4	1013.8	7.0	1.6	621.8
CV (%)	-	5.5	20.9	18.8	8.9	6.9	2.2	1.2	1.9	5.2	1.0

ns: não significativo, *: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, CV: coeficiente de variação.

Tabela 4- Desdobramento da interação tripla (Fonte x Inoculação x Dose) com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada ao teor de clorofila b (*Chl b*), clorofila total (*Chl total*), antocianina e diâmetro do colmo (DC) em híbrido de milho sem e com inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Variável	Fonte de N	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
		0	60	120	180				
Chl b (mmol kg ⁻¹ MF)	Ureia sem	0,0014	0,0013	0,0018	0,0006	Y = -0,00000008x ² + 0,00001x + 0,001	0,60	0,0016	65,1
	Ureia com	0,0014	0,0007	0,0006	0,0009	y = 0,00000007x ² - 0,00001x + 0,001	0,99	0,0009	71,4
	Inibidor sem	0,0008	0,0011	0,0020	0,0008	y = -0,0000001x ² + 0,00002x + 0,001	0,65	0,0017	100,0
	Inibidor com	0,0009	0,0021	0,0019	0,0012	y = -0,0000001x ² + 0,00002x + 0,001	0,97	0,002	100,0
Chl total (mmol kg ⁻¹ MF)	Ureia sem	0,0026	0,0030	0,0042	0,0023	y = -0,0000002x ² + 0,00003x + 0,002	0,63	0,0036	75,0
	Ureia com	0,0038	0,0027	0,0025	0,0040	y = 0,0000002x ² - 0,00003x + 0,003	0,97	0,0026	75,0
	Inibidor sem	0,0025	0,0046	0,0040	0,0035	y = -0,0000002x ² + 0,00004x + 0,002	0,82	0,0046	100,0
	Inibidor com	0,0024	0,0048	0,0043	0,0032	y = -0,0000002x ² + 0,00005x + 0,002	0,92	0,0056	125,0
Antocianina (mg 100 g ⁻¹ MF)	Ureia sem	0,0042	0,0041	0,0038	0,0004	y = -0,00002x + 0,0048	0,66	-	-
	Ureia com	0,0028	0,0051	0,0008	0,0006	y = -0,00002x + 0,0039	0,45	-	-
	Inibidor sem	0,0037	0,0021	0,0011	0,0012	y = -0,00001x + 0,0033	0,82	-	-
	Inibidor com	0,0109	0,0021	0,0020	0,0013	y = 0,0000006x ² - 0,0001x + 0,010	0,92	0,0062	83,3
DC (mm)	Ureia sem	12,86	15,23	17,39	16,86	y = -0,0002x ² + 0,0599x + 12,74	0,97	17,22	149,7
	Ureia com	14,27	15,87	16,94	17,26	y = 0,0167x + 14,585	0,92	-	-
	Inibidor sem	13,73	16,79	15,52	17,05	y = 0,0145x + 14,471	0,54	-	-
	Inibidor com	14,44	15,50	17,45	17,44	y = 0,0183x + 14,571	0,89	-	-

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

Tabela 5- Desdobramento do efeito do N, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada a altura da planta (AP), área foliar (AF), massa seca do colmo (MSC), massa seca da raiz (MSR) Fotossíntese (A) e Condutância estomática (gs) em híbrido de milho submetido a doses nitrogenadas.

Variável	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
	0	60	120	180				
AP (cm)	93.59	107.93	124.62	120.18	y = -0.0013x ² + 0.39x + 92.42	0.95	122.5	152.1
AF (dm ²)	29.02	36.90	44.16	43.86	y = -0.0006x ² + 0.18x + 28.68	0.98	43.6	157.7
MSC (g planta ⁻¹)	19.24	30.86	40.89	40.73	y = -0.0008x ² + 0.27x + 18.81	0.98	41.8	169.6
MSR (g planta ⁻¹)	8.40	11.03	13.86	14.06	y = -0.0002x ² + 0.06x + 8.26	0.98	13.2	158.5
A (μmol. m ⁻² . s ⁻¹)	14,53	16,81	18,81	19,04	y = 0,0259x + 14,977	0,91	-	-
gs (μmol. m ⁻² . s ⁻¹)	0,13	0,13	0,16	0,15	y = 0,0002x + 0,1335	0,70	-	-

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

Tabela 6- Desdobramento do efeito dose da análise de variância com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada ao número de folha (NF), massa seca da folha (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), fotossíntese (A), Condutância estomática (GS) e carotenoides (CAR) em híbrido de milho, submetida à ausência e presença de *Azospirillum brasilense* e a dose de nitrogênio.

Variável	<i>Azospirillum</i>	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
		0	60	120	180				
NF	Ausência	11,75	13,50	13,25	14,25	y = -0,00005x ² + 0,0215x + 11,91	0,83	14,22	180,0
	Presença	12,42	13,14	14,00	13,62	y = -0,00008x ² + 0,021x + 12,36	0,93	13,73	131,2
MSF (g planta ⁻¹)	Ausência	13,35	22,26	24,69	28,20	y = -0,0004x ² + 0,1459x + 13,72	0,97	27,03	182,3
	Presença	17,35	20,81	27,52	25,73	y = -0,0004x ² + 0,1187x + 16,76	0,89	25,57	148,3
MSPA (g planta ⁻¹)	Ausência	31,79	57,78	67,55	75,27	y = -0,0013x ² + 0,4621x + 32,49	0,99	73,56	177,7
	Presença	40,63	51,73	72,77	66,68	y = -0,0012x ² + 0,3802x + 38,78	0,89	68,89	158,4
MST (g planta ⁻¹)	Ausência	39,28	69,26	80,21	90,14	y = -0,0014x ² + 0,5233x + 40,18	0,98	89,08	186,8
	Presença	49,93	62,32	87,83	79,95	y = -0,0014x ² + 0,446x + 47,60	0,87	83,12	159,2
A (μmol. m ⁻² . s ⁻¹)	Ausência	13,07	16,44	17,43	18,23	y = 0,0274x + 13,829	0,87	-	-
	Presença	16,00	17,18	20,20	19,85	y = 0,0243x + 16,125	0,84	-	-
GS (μmol. m ⁻² . s ⁻¹)	Ausência	0,126	0,130	0,150	0,156	y = 0,0002x + 0,1251	0,95	-	-
	Presença	0,142	0,140	0,170	0,158	y = 0,1543	-	-	-
CAR (mmol kg ⁻¹ MF)	Ausência	0,001	0,002	0,001	0,001	y = -0,00000007x ² + 0,000009x + 0,001	0,99	0,001	64,2
	Presença	0,002	0,001	0,001	0,001	y = -0,000005x + 0,001	0,98	-	-

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

Tabela 7- Resumo da análise de média da interação Fonte x Inoculação, em conformidade com ausência e presença de *Azospirillum brasilense* em semente de milho, na transpiração (mmol m⁻²s⁻¹) e concentração de clorofilas a (mmol kg⁻¹MF).

Fonte de N	<i>Azospirillum</i>	Transpiração	Clorofila a
Ureia	Ausência	2.85±0.55 Ab	0.0016±0.0008 Ba
	Presença	3.48±0.57 Aa	0.0021±0.0006 Aa
Inibidor	Ausência	3.27±0.70 Aa	0.0025±0.0011 Aa
	Presença	3.23±0.66 Aa	0.0021±0.0007 Aa

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de fonte de N (ureia e inibidor sob mesmo tratamento de inoculação) e letras minúsculas entre tratamentos de inoculação (ausência e presença *Azospirillum* sob mesma fonte de N) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0.05). Valores descritos correspondem às médias de 4 repetições e Desvio Padrão.

Tabela 8- Desdobramento da interação Fonte x Dose, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na relação de carbono interno e externo (*Ci/Ca*), transpiração (*E*), clorofila a (*Chl a*) e carotenoides (*CAR*), em semente de híbrido de milho submetida a diferentes fontes de nitrogênio.

Variável	Fontes de N	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Y _{met}	N _{met}
		0	60	120	180				
<i>Ci/Ca</i> (μmol mol ⁻¹)	Ureia	0,47	0,44	0,48	0,488	y = 0.4724	-	-	-
	Inibidor	0,54	0,42	0,54	0,53	y = 0,000007x ² - 0,0012x + 0,522	0,36	0,47	85,71
<i>E</i> (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Ureia	2,97	3,48	3,00	3,20	y = 3.1666	-	-	-
	Inibidor	3,09	2,84	3,36	3,62	y = 3.2337	-	-	-
<i>Chl a</i> (mmol kg ⁻¹ MF)	Ureia	0,002	0,002	0,002	0,002	y = 0.0019	-	-	-
	Inibidor	0,002	0,003	0,002	0,002	y = -0,00000008x ² + 0,00002x + 0,001	0,43	0,003	125
<i>CAR</i> (mmol kg ⁻¹ MF)	Ureia	0,001	0,002	0,002	0,000	y = -0,0000001x ² + 0,00001x + 0,001	0,99	0,0016	50,00
	Inibidor	0,002	0,001	0,001	0,001	y = 0,00000005x ² - 0,00001x + 0,001	0,97	0,0011	100

R² - coeficiente de determinação; Y_{met} – valor estimado da máxima eficiência técnica; N_{met} – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

3 *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO COM ADUBAÇÃO NITROGENADA PROMOVE MELHORIA NOS TEORES DE MACRONUTRIENTES DO MILHO*

Juscelino Gonçalves Palheta¹, Ricardo Shiguera Okumura², Marta Simone Mendonça Freitas³, Marlene Evangelista Vieira³, Gerson Diego Pamplona Albuquerque¹, Diana Jhulia Palheta de Sousa¹, Jessica Suellen Silva Teixeira¹, Myriam Galvão Neves¹ And Cândido Ferreira de Oliveira Neto¹

¹Federal Rural University of Amazonia, Avenida Perimetral, 2501, Curió- Utinga, Belém, Pará.

²Federal Rural University of Amazonia, PA-275 s/n Zona Rural, Parauapebas – PA.

³Mineral Plant Nutrition Laboratory, University Estadual Norte Fluminense, Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

***Artigo aceito e publicado na revista Australian Journal of Crop Science, junho de 2021.**

Resumo

A carência de pesquisas sobre os benefícios das bactérias promotoras de crescimento, associado com fontes e doses de fertilizantes nitrogenados no milho em regiões tropicais tem proporcionado muitas dúvidas sobre adoção de manejo nitrogenado, assim como uma recomendação de dose adequada para a produção de milho. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito das doses e fontes de nitrogênio associadas à ausência e presença de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* nos teores de N, P, K, Ca, Mg e S na raiz, colmo e folha de plantas de milho. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 x 2, sendo constituído de quatro doses de nitrogênio (0; 60; 120; e 180 kg ha⁻¹ de N), duas fontes de N (ureia comum e ureia tratada com inibidor da enzima urease) com presença e ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense*, com quatro repetições cada. Os resultados identificaram que as doses de N influenciaram positivamente a concentração de N, P, S no colmo do milho. A ureia com inibidor de urease não foi eficiente na fertilização nitrogenada, fornecendo concentração semelhante de macronutrientes a ureia comum. A inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu maior concentração de N no colmo, Ca e Mg na raiz. De maneira geral, o tratamento de semente com *Azospirillum brasilense* na dose de 180 kg ha⁻¹ de N proporcionou maior concentração de macronutrientes no milho, independentemente das fontes ureia comum ou ureia tratada com inibidor de urease.

Palavras-chave: bactéria diazotrófica, teor nutricional, microrganismo do solo, inibidor de urease, *Zea mays* L.

Abstract

The lack of studies on the benefits of growth-promoting bacteria, associated with sources and doses of nitrogen fertilizers in corn in tropical regions has raised many doubts about the adoption of nitrogen management, as well as a recommendation of the adequate dose for corn production. Thus, the objective of the study was to evaluate the effect of doses and sources of nitrogen associated with the absence and presence of seed inoculated with *Azospirillum brasilense* in the contents of N, P, K, Ca, Mg and S in the root, culm and leaf of corn plants. The experimental design adopted was a completely randomized, in a 4 x 2 x 2 factorial scheme, consisting of four nitrogen doses (0; 60; 120; and 180 kg ha⁻¹ of N), two sources of N (common urea and urea treated with urease inhibitor) and absence and presence of inoculation with *Azospirillum brasilense*, with four replications. The results identified that the N doses positively influenced the concentration of N, P, and S in the corn culm. Urea with urease inhibitor was not efficient in optimizing nitrogen fertilization, providing similar accumulations of macronutrients to common urea. The inoculation with *Azospirillum brasilense* promoted a higher concentration of N in the culm, Ca and Mg in the root. In general, seed treatment with *Azospirillum brasilense* at a dose of 180 kg ha⁻¹ of N provided a higher concentration of macronutrients in corn, regardless of the sources of common urea or urea treated with a urease inhibitor.

Keywords: diazotrophic bacteria, nutritional content, soil microorganism, urease inhibitor, *Zea mays L.*

3.1 Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea de grande importância socioeconômica para o cenário agrícola mundial, sendo utilizado principalmente na alimentação humana e animal. Na safra de 2018/2019, a produção brasileira alcançou a estimativa de área plantada de 17.254 milhões hectares, colocando o país como terceiro maior produtor mundial, precedido pelos Estados Unidos e China, além de ser o segundo maior exportador do grão (Conab, 2019).

O nitrogênio é o nutriente mais restritivo e oneroso do processo de produção de milho, e juntamente com o arroz e o trigo utiliza cerca de 50% de todo fertilizante nitrogenado (Galindo et al., 2020), em que a adubação suplementar de N é fundamental para atender às exigências das culturas não leguminosas durante seu ciclo produtivo (Teixeira Filho et al., 2014). Assim, determinar as doses adequadas de nitrogênio e a melhoria no manejo da adubação nitrogenada torna-se uma importante decisão agrônômica, especialmente quando os custos do fertilizante são elevados (Galindo et al., 2019).

Para aquisição de altas produtividades de grãos são aplicadas elevadas doses de nitrogênio, especialmente em solos tropicais, uma vez que são altamente intemperizados e incapazes de fornecer macro e micronutrientes adequadamente para o desenvolvimento do milho (Galindo et al., 2018), além do mais, as perdas de N que podem superar 30% nos solos tropicais (Coelho, 2018) tornam a fertilização nitrogenada com elevado custo de produção (Souza et al., 2019).

No Brasil, a fonte de nitrogênio mais utilizada é a ureia, por apresentar alto teor de nutriente, alta solubilidade, facilidade de mistura com outras fontes e menor custo de produção, no entanto, apresenta desvantagem como elevadas perdas por volatilização de amônia (NH₃), principalmente em países de regiões tropicais, em que existe predomínio de altas temperaturas (Frazão et al., 2014). Uma opção para reduzir as perdas por volatilização é adição de inibidores de urease como a triamida N- (n-butil) tiofosfórica (NBPT) à ureia, para reduzir a volatilização da NH₃ (Manunza et al., 1999; Coelho et al., 2018), aumentando a eficiência de utilização do nitrogênio aplicado.

Outra alternativa para redução dos custos dos fertilizantes nitrogenados é o tratamento de sementes com inóculos contendo bactérias promotora de crescimento (Hungria, 2011). Além de ser economicamente viável e ambientalmente correta, representa uma busca mais sustentável da agricultura em regiões tropicais (Galindo et al., 2018; Pereira et al., 2020). Adicionalmente, os microrganismos do solo como *Azospirillum brasilense* desempenham papel fundamental no desenvolvimento sustentável dos ecossistemas, possibilitando a

incorporação de nitrogênio atmosférico (N₂) ao solo e a produção e exsudação de hormônio de crescimento de plantas como auxinas, giberelinas e citocinas no sistema radicular (Alovisi et al., 2018).

Apesar de muitos estudos de pesquisa com nitrogênio terem sido desenvolvido em condições tropicais, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos na região Norte do Brasil, e como consequência muitas dúvidas têm surgido sobre os benefícios da adoção de *Azospirillum brasiliense* e fontes nitrogenadas, assim como uma recomendação de dose adequada de N para a produção de milho nas condições ambientais da região amazônica.

Diante disso, a hipótese do estudo foi que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* com as fontes e doses de nitrogênio promovem absorção de macronutrientes no milho. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito das doses e fontes de nitrogênio associado à ausência e presença de inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no teor de N, P, K, Ca, Mg e S na raiz, colmo e folha de milho.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Descrição da área e análise de solo

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil. Apresentando como coordenadas geográficas 48°26'18.0" de longitude Oeste de Greenwich e 1°27'17.3" S de latitude Sul. O clima, segundo a classificação de Köppen é do tipo Afi, com precipitação média de pelo menos 60 mm ao mês, sem apresentar período de estiagem definido. O substrato utilizado no experimento foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm em Latossolo Amarelo distrófico (Embrapa, 2018), coletado em área de capoeira aberta da Universidade Federal Rural da Amazônia. Em seguida, foram retiradas amostras compostas para análise física e química do solo, no instituto brasileiro de análises (IBRA), conforme metodologia descrita por (Silva, 1999). Na Tabela 1 os resultados demonstraram a necessidade da correção de apenas o teor de potássio com aplicação de 60 kg ha⁻¹ com cloreto de potássio, seguindo recomendação de Oliveira *et al.* (2018). Os dados climáticos da área experimental foram coletados durante a condução do experimento (Figura 1).

3.2.2 Delineamento experimental e Condução do experimento

A semente utilizada foi o híbrido de milho K9960 VIP3 (classificado como alto potencial produtivo, ótima sanidade de colmo, elevada adaptabilidade de plantio para regiões tropicais

/ subtropicais e ciclo precoce), usualmente adotado na região sudeste do Estado do Pará. Após a coleta do solo foi realizado peneiramento em peneira de 2 mm, em seguida a homogeneização de 768 kg de solo em 256 kg de matéria orgânica, oriundo de resíduos de poda de mangueira. Os vasos com dimensão de 25x32 cm (490,8 cm³) foram preenchidos com 16 kg do substrato final, na proporção de 3:1, respectivamente.

O delineamento adotado foi o de bloco inteiramente casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 x 2, assim especificado: quatro doses de N (0; 60; 120 e 180 kg ha⁻¹ de N), duas fontes de N, ureia comum (com 45% de N) e ureia tratada com enzima de inibidor de urease – NBPT (com 45% de N) e presença e ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense*, com quatro repetições.

Para os tratamentos com inoculação, as sementes foram homogeneizadas juntamente com o inoculante (200 ml diluído em água equivalente a 10% do peso das sementes, estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração 2×10^8 UFC ml⁻¹), inoculadas uma hora antes da semeadura (Leite et al., 2019). As doses de nitrogênio foram aplicadas em cobertura em doses única, realizadas aos 10 DAE (dias após a emergência das plantas), início do desenvolvimento do sistema radicular secundário seguindo recomendação de (Jadoski et al. 2016)

Os baldes receberam irrigação diária controlada, para repor a água evapotranspirada durante o período experimental, e o teor de água do solo foi mantido na capacidade de campo, por meio do método gravimétrico seguindo a metodologia de (Klar et al. 1966), que consiste na reposição da lâmina de irrigação baseada na pesagem diária dos baldes. O controle de plantas daninhas e pragas foram realizados manualmente e diariamente, através do arranque mecânico e catação manual, respectivamente.

3.2.3 Avaliações nas plantas

As avaliações foram realizadas por ocasião do pleno florescimento masculino (estádio fenológico V_T), isto é, do pendoamento das plantas (50 dias após a emergência), período que estabilizou o crescimento da parte aérea, sendo mensurada a concentração de macronutriente no híbrido de milho (Ritchie et al, 1993).

3.2.4 Avaliação nutricional

Para a determinação de macronutrientes, o material foi lavado em água deionizada e seco em estufa com circulação forçada de ar a 65 ± 2 °C, até atingir massa constante. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança analítica para a obtenção da matéria seca e moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de 20 mesh. Posteriormente, os materiais foram

armazenados e identificados e encaminhados para o laboratório de fitotecnia/setor nutrição mineral de plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- Rio de Janeiro, sendo determinado o teor de nitrogênio (N) por meio da digestão sulfúrica pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Enquanto o fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) foram submetidos à digestão com ácido nítrico concentrado (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sistema de digestão aberta e quantificados em plasma (ICPE-9000) da marca Shimadzu® (Peters, 2005).

3.2.5 Análise estatística

Os resultados das análises de macronutrientes do tecido foliar, radicular e colmo foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente. Atendidas as pressuposições básicas, realizou-se a análise de variância, na qual procedeu-se aos desdobramentos que se mostraram significativos. Para avaliar o efeito das doses de nitrogênio, fontes de adubos e inoculação no híbrido de milho utilizou o teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises de regressão foram realizadas no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2019).

3.3 Resultados

3.3.1 Concentração de macronutriente na folha do milho

As doses de N apresentaram efeito significativo na concentração de P, K, Mg e S no tecido foliar. Para o teor de P houve interação dos fatores fontes x inoculação e fontes x doses (Tabela 10), em que o desdobramento da interação fontes \times inoculação mostrou que os tratamentos ureia na presença de *Azospirillum brasilense* e inibidor de urease na ausência e presença da bactéria foram iguais estatisticamente, diferindo do tratamento ureia na ausência da inoculação, com os valores de 3,26, 3,40 3,32 e 2,95 g kg^{-1} , respectivamente (Tabela 13), enquanto a interação fontes \times doses apresentou melhor ajuste da equação quadrática, com máxima eficiência técnica de 2,88 e 2,98 g kg^{-1} nas doses estimadas de 122,5 e 149 kg ha^{-1} para ureia convencional e inibidor de urease – NBPT, respectivamente (Tabela 15).

Observou-se também o efeito significativo na concentração de K no tecido foliar, com interação tripla (fontes x inoculação x doses), ajustando ao modelo linear decrescente para adubação com ureia sem e com a inoculação, e ureia com inibidor de urease - NBPT na presença de *Azospirillum brasilense*. No caso do inibidor de urease sem a bactéria, houve

ajuste à resposta quadrática com máxima eficiência técnica de 6,8 g kg⁻¹ de K na dose estimada de 137,1 kg ha⁻¹ de N (Tabela 11).

A aplicação de N influenciou significativamente a concentração de Mg no tecido foliar, com efeito da interação fontes x doses, onde os resultados não se ajustaram a nenhum modelo matemático, com média de 1,64 e 1,87 g kg⁻¹ para planta de milho com ureia e 1,88 e 1,64 g kg⁻¹ para o inibidor de urease -NBPT na dose 0 e 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 15).

Para a concentração do S no milho, a análise estatística apresentou efeito significativo na folha, com interação tripla, em que a ureia na ausência e presença de *Azospirillum brasilense* se ajustou à função quadrática com máxima eficiência técnica de 0,70 e 0,69 g kg⁻¹ nas doses estimadas de 105 e 145 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. A aplicação da fonte de ureia tratada com inibidor da enzima urease na ausência e presença da bactéria apresentou comportamento linear decrescente (Figura 11).

3.3.2 Concentração de macronutriente no colmo do milho

A análise de variância mostrou efeito das doses para a concentração de N no colmo da planta de milho (Tabela 12), em que o desdobramento da interação fontes × inoculação revelou que o tratamento ureia com a presença de *Azospirillum brasilense* e inibidor da urease na ausência e presença da bactéria foram iguais estatisticamente, diferindo apenas do tratamento ureia na ausência da inoculação, com os valores de 3,18, 3,40 3,01 e 2,88 g kg⁻¹, respectivamente (Tabela 13).

Para o fator isolado doses de N no colmo de plantas de milho houve melhor ajuste para a equação linear crescente, nas quais o aumento da adubação nitrogenada promoveu concentração do nutriente no colmo, variando de 2,69 para 3,43 g kg⁻¹ nas doses 0 a 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 12).

As doses de N influenciaram significativamente a concentração de fósforo no colmo do milho, mostrando efeito do fator doses, com resposta quadrática, com a máxima eficiência técnica de 2,71 g kg⁻¹ de P sendo obtida na dose de 141,66 kg ha⁻¹ de N (Tabela 12).

Adubação nitrogenada influenciou significativamente a concentração de K no colmo do milho, com efeito isolado das doses, apresentando uma resposta linear decrescente para o teor de potássio (Tabela 12).

No caso do cálcio, a análise de variância mostrou interação significativa para a concentração de Ca no colmo da planta do milho (Tabela 10). Para o colmo do milho houve efeito da interação fontes x doses, com uma resposta linear crescente para ureia simples, enquanto o

inibidor de urease-NBPT não apresentou nenhum ajuste aos modelos matemáticos, com média de 2,57 e 2,80 g kg⁻¹ na dose 0 e 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 15).

As doses de N influenciaram significativamente o teor de S no colmo do milho, com efeito dos fatores fontes x inoculação e do fator isolado doses. No caso da interação o desdobramento das médias mostrou que os tratamentos ureia com ausência e inibidor na presença de *Azospirillum brasilense* e inibidor de urease na ausência da bactéria, foram iguais estatisticamente, diferindo do tratamento inibidor de urease na presença e ureia na ausência de inoculação (Tabela 13), e para o fator isolado doses, houve uma resposta linear crescente para a concentração de S no colmo do milho (tabela 12).

3.3.3 Concentração de macronutriente na raiz do milho

Em relação à concentração de N na raiz, houve efeito significativo para os fatores isolados doses e fontes, mostrando ajuste para a equação linear decrescente (Tabela 15).

O efeito da interação fontes x inoculação x doses foi observado para o teor de P, K, Ca, e Mg na raiz. O fósforo apresentou melhor ajuste à equação quadrática, com máxima eficiência técnica de 1,3 g kg⁻¹ de P obtida na dose de 77,5 kg ha⁻¹ de N, adubado com ureia na ausência da inoculação, e a aplicação de ureia com *Azospirillum brasilense* não houve ajuste a nenhum modelo matemático, com média de 1,3 e 1,3 g kg⁻¹ na dose 0 e 180 kg ha⁻¹ de N respectivamente, enquanto a ureia tratada com inibidor de urease - NBPT na ausência e presença da bactéria resultaram em melhor ajuste à equação linear decrescente (Tabela 11).

O incremento das doses de N influenciou o teor de K no tecido radicular, promovendo efeito na interação tripla. Para absorção do K na raiz, houve uma resposta linear decrescente para tratamento com ureia na ausência de *Azospirillum brasilense*, contudo a aplicação de ureia com presença da bactéria e do inibidor da urease na ausência e presença de *Azospirillum* proporcionaram melhor ajuste à equação quadrática, com máxima eficiência técnica de 3,69, 1,40 e 2,80 g kg⁻¹ de K obtido nas doses de 0, 121,3 e 34,2 kg ha⁻¹ de N respectivamente (Tabela 11).

Em relação à absorção do cálcio pelo sistema radicular, o incremento das doses de N influenciou o teor de Ca, com efeito na interação tripla (fontes x inoculação x doses). Entretanto a ureia na ausência de *Azospirillum brasilense* não proporcionou ajuste a nenhum modelo matemático, com média de 1,4 e 1,3 g kg⁻¹ na dose de 0 e 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente, enquanto a ureia na presença da bactéria promoveu melhor ajuste para a equação quadrática, com máxima eficiência técnica de 1,6 g kg⁻¹ na dose estimada de 71,4 kg

ha⁻¹ de N, no caso da ureia tratada com NBPT na ausência e presença de inoculação da bactéria apresentou ajuste à equação linear decrescente (Tabela 11).

As doses de N promoveram interação significativa na concentração de Mg no tecido radicular, com efeito na interação tripla (fontes x inoculação x doses), com uma resposta quadrática, com a máxima eficiência técnica de 0,85 e 0,93 g kg⁻¹ obtido nas doses de 92,85 e 50,00 kg ha⁻¹ de N para ureia na ausência e presença de *Azospirillum brasilense* respectivamente, enquanto a fonte com inibidor de urease na ausência e presença da inoculação com a bactéria resultou em ajuste ao modelo linear decrescente (Tabela 11).

A análise de variância verificou efeito para a concentração de S na raiz (Tabela 10), em que o desdobramento da interação fonte × inoculação mostrou que o tratamento inibidor de urease e ureia na ausência de *Azospirillum brasilense* e ureia e inibidor de urease na presença da bactéria diferiram estatisticamente com os seguintes valores de 0,77, 0,73, 0,76 e 0,71 g kg⁻¹, respectivamente (Tabela 13). Em relação a inoculação com *Azospirillum brasilense* houve uma resposta linear decrescente para teor de S na raiz com ausência do *Azospirillum brasilense* e uma resposta quadrática com máxima eficiência técnica de 0,88 g kg⁻¹ na dose de 50 kg ha⁻¹ de N (Tabela 14). No caso do Desdobramento da interação fontes x doses, houve uma resposta linear decrescente, no caso da ureia houve uma resposta quadrática para o inibidor de urease, com máximo valor de 0,97 g kg⁻¹ na dose de 120 kg ha⁻¹ de N (Tabela 15).

3.4 Discussão

3.4.1 Concentração de macronutriente na folha do milho

As doses de N influenciaram as concentrações de P, Mg, K e S no tecido foliar (Tabela 10). Os valores relacionados a teores de fósforo e magnésio na folha do milho estão na faixa ideal recomendado para a cultura (Cantarella et al., 1997), entre 2,0 - 4,0 e 1,5 - 5,0 g kg⁻¹ respectivamente (Tabela 13). Independente das fontes e doses de N testadas, não comprometeu o desenvolvimento da cultura, enquanto à concentração média de potássio e enxofre na folha ficou abaixo do ideal recomendado para o milho, que varia de 17 a 35 e 1,5 a 3 g kg⁻¹ respectivamente (Tabela 11) (Cantarella et al., 1997). O fósforo é um dos nutrientes muito demandado pelo milho, sendo responsável pelo desenvolvimento e o rendimento da cultura (Dhillon et al., 2017), assim a disponibilidade adequada de P favorece o desenvolvimento inicial do sistema radicular, melhorando o crescimento da planta, desempenhando um papel fundamental na nutrição e desenvolvimento das plantas (Lollato et al., 2019), como na composição de ATP (trifosfato de adenosina) que atua no armazenamento

e transporte de energia para a síntese de compostos orgânicos e absorção ativa de nutrientes (Marschner, 2012; Pereira, 2020).

Quanto a concentração de Mg, o teor adequado para planta é importante, uma vez que é um nutriente essencial para produção de moléculas de clorofilas, assim como para estabilização conformacional de macromoléculas, ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares, manutenção de atividades enzimáticas, como H^o-ATPase, cinases, polimerases e homeostase de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Galindo et al., 2020).

O teor de K foliar pode reduzir com o aumento das doses de N, independentemente das fontes de N e da inoculação das sementes com *Azospirillum*, resultados similares foram relatados por Vasconcelo et al. (2016), estudando o conteúdo de K nas folhas de milho em associação com doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense*. A aplicação de K deve ser racional, parcelada para favorecer a otimização, pois o aumento das doses de aplicação pode resultar em perdas e menor utilização pelo sistema de cultivo do milho. Em relação ao teor de S na folha, observou-se que não houve efeito do incremento de N na acumulação de S na folha de milho, Longhini et al. (2016) verificaram que as doses de N não influenciaram na concentração de S nas folhas de milho, estando abaixo dos níveis críticos.

3.4.2 Concentração de macronutriente no colmo do milho

A concentração de nitrogênio no colmo de milho nas plantas inoculadas com a bactéria pode ser atribuída ao processo de fixação biológica de N e a função secretora de hormônio de crescimento como auxina, que age estimulando o crescimento de pelos radiculares, beneficiando absorção de fertilizante nitrogenado (Alovisio et al., 2018). A assimilação de N pelas plantas é um bom indicativo da resposta nutricional, uma vez que estabelece o teor de nitrogênio durante o período de crescimento das plantas em condições específicas (Coelho et al., 2018). Para os mesmos autores, a perda de nitrogênio pode ser reduzida com a aplicação de ureia tratada com inibidor da enzima urease devido à diminuição da volatilização do amônio no solo, aumentando a disponibilidade de N para o crescimento das plantas, o que pode justificar a concentração de nitrogênio no colmo.

O incremento das doses de N influenciou as concentrações de P, S, K e Ca no colmo do milho. Considerando o efeito isolado das doses de nitrogênio, verificou-se que o aumento na adubação nitrogenada promoveu concentração de P e S no colmo da planta, no entanto, relação inversa, foi observada para concentração do K. Pelos resultados obtidos, observou-se a importância do N na nutrição das plantas de milho e na absorção de nutrientes (Galindo et al. 2016), por ser o nutriente que mais interfere no crescimento e na produtividade,

principalmente nas gramíneas (Noor, 2017). O N pode ser encontrado em concentrações mais elevadas nos tecidos das plantas, sendo necessário em maior quantidade pela cultura do milho (Liu et al., 2017). Assim, a maior disponibilidade do N para as plantas pode ter favorecido o desenvolvimento do sistema radicular como ocorrido nesse trabalho que ao explorar um volume maior de solo, pode ter absorvido maiores quantidades de nutrientes, como N, P e S, resultado similar também foi relatado por Vettorazzi et al. (2019).

Em relação a concentração de S no colmo de plantas de milho inoculadas, Galindo et al. (2016) encontraram em plantas de milho cultivadas a partir de sementes que foram inoculadas com a bactéria concentração de S na parte aérea superior às plantas não inoculadas, justificando tal resultado pela maior fixação de CO₂ e incremento na capacidade de fixação biológica de nitrogênio. As plantas inoculadas com a bactéria apresentam boa eficiência na fixação de N, promovido pelo *Azospirillum brasilense* que possui a capacidade de fixação N₂ e melhoria do sistema radicular, aumentando a eficiência da fertilização nitrogenada (Alovisi et al., 2018).

Em relação ao teor de K no colmo, observou-se que o nutriente foi afetado negativamente pela adubação nitrogenada. Batista; Monteiro (2010), avaliando o estado nutricional do capim-marandu observaram redução da concentração de K nas brotações da espécie. No entanto, Petean et al. (2019) relataram que o nível de potássio nas folhas foi afetado positivamente pela adubação nitrogenada, contrariando os resultados obtidos neste estudo. Cabe ressaltar que K não compõem nenhum composto celular da planta (Malavolta et al., 1997), sendo que todo potássio proveniente de resíduos de culturas é liberado rapidamente, ficando indisponível para a planta (Calonego et al., 2005; Galindo et al., 2016). Contudo, cabe ressaltar que a redução da concentração de K observado neste estudo, também pode estar relacionado a produção de material seca do híbrido de milho.

Para a concentração de Ca no colmo do milho, verificou-se efeito da interação fontes x doses, em que a ureia foi mais eficiente na absorção do cálcio comparado ao inibidor de urease – NBPT, principalmente nas maiores doses, porém o inibidor de urease reduz a disponibilidade de N por um período de tempo (Galindo et al., 2020). Para Teixeira et al. (2010), que ao avaliar o efeito das doses de N e do milheto na cultura do feijão, encontraram maior teor de Ca para a dose mais alta de N aplicada no plantio. No entanto, é importante ressaltar que aplicação de ureia tratada com NBPT influenciou positivamente a concentração de Ca no colmo do milho, embora numa taxa menor comparado a ureia convencional.

3.4.3 Concentração de macronutriente na raiz do milho

A redução da concentração de N, P, K, Ca, Mg e S no sistema radicular em decorrência da adubação nitrogenada, independentemente das doses, fontes e inoculação das sementes testada no estudo, Galindo et al. (2016) afirmaram que o efeito pode estar associado à translocação dos nutrientes para a parte aérea da planta, uma vez que existe um limite da demanda nutricional da planta, isto é, os vegetais absorvem apenas uma parte dos nutrientes disponíveis e o restante pode ser perdido via lixiviação e volatilização, diminuindo a eficiência da fertilização nitrogenada, relatado na literatura como a lei dos retornos decrescentes. Além do mais, o fato de existir diversos microrganismos no solo com alta afinidade por nutrientes poderia indisponibilizar ou favorecer a competição das raízes com os micróbios do solo pelos nutrientes minerais disponíveis (Barracough et al., 2010), os autores retificam que aplicação parcelada do nitrogênio durante o crescimento vegetativo do milho seria recomendada, pois adubação em dose única no início do desenvolvimento, como ocorrido no estudo, favorece as perdas de N. No entanto, o parcelamento da adubação nitrogenada pode aumentar o custo de produção, tornando o cultivo do milho inviável para pequenos agricultores.

Apesar da diferença significativa na utilização das fontes de nitrogênio, verificou-se que a aplicação de ureia convencional e inibidor de urease – NBPT resultaram na mesma eficiência de absorção de S na raiz, sendo atribuído ao fato do NBPT ser altamente ativa, tornando-o ineficiente (Galindo et al., 2016), nessa situação o recomendado seria a utilização da ureia convencional pela melhor relação custo benefício.

Galindo et al. (2016) relatam ainda que a maior concentração de N melhora o desenvolvimento do sistema radicular, favorecendo a difusão entre o fosfato e as raízes no solo, promovendo maior absorção dos nutrientes e água, o que resulta na maior absorção e translocação de P e Mg para as folhas. Moraes et al. (2015) observaram o aumento da absorção de P em função do fornecimento de N via adubação, sugerindo tal resultado a maior disponibilidade de N e seu efeito sinérgico na assimilação de P.

3.5 Conclusão

O incremento nas doses de N influencia positivamente a concentração de N, P, S no colmo do milho. A ureia tratada com inibidor de urease não é eficiente na otimização da fertilização nitrogenada, fornecendo teor semelhantes de macronutrientes comparada a ureia simples, principalmente nos teores de P na folha, N, Ca e S no colmo e K e S na raiz. A inoculação com *Azospirillum brasilense* promove maior concentração de N no colmo, Ca e Mg na raiz. A fertilização nitrogenada reduz a concentração de macronutriente na raiz do milho, independentemente das fontes de N e da inoculação das sementes com *Azospirillum*

brasiliense. A dose de 180 kg ha⁻¹ de N associada à inoculação das sementes com *Azospirillum brasiliense* proporciona maior concentração de macronutrientes no milho, independentemente da aplicação de ureia comum ou ureia tratada com inibidor da urease.

3.6 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Amazônia de Apoio aos Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (FAPESPA) pela concessão da bolsa de estudo, à Universidade Federal Rural da Amazônia, ao Grupo de Estudos da Biodiversidade de Plantas Superiores e ao laboratório de fitotecnia de nutrição mineral de plantas da Universidade Estadual do Norte fluminense Darcy Ribeiro, pelo apoio financeiro e estrutural para execução deste manuscrito.

3.7 Referências

- Alovisi AMT, De Souza Fernandes J, Alovisi AA, Perondi LG, Tokura LK, Da Silva RS, De Araújo WA (2018) Evaluation of *Urochloa decumbens* cv. Basilisk in Response to Nitrogen Fertilization and Inoculation With Diazotrophic Bacterium. *Journal of Agricultural Science*, Vol. (10), N.12.
- Barraclough PB, Lopez-Bellido R, Hawkesford M J (2014) Genotypic variation in the uptake, partitioning and remobilization of nitrogen during grain-filling in wheat. *Field Crop Res.* 156: 242–248.
- Batista K, Monteiro FA (2010) Alterations in potassium, calcium and magnesium concentrations in marandu palisadegrass fertilized with nitrogen and sulfur rates. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, p. 151-161.
- Calonego JC, Foloni JSS, Rosolem CA (2005) Potassium leaching from plant cover straw at different senescence stages after chemical desiccation. *Revista Brasileira Ciências de Solo*, v.29, p.99-108.
- Cantarella H, Van Raij B, Camargo CEO (1997) Cereals. In: Van Raij B, Cantarella H, Quaggio J A, Furlani AMC, editors. Liming and fertilization recommendations for the State of São Paulo. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas; p. 43–70.
- Catuchi TA, Vítolo HF, Bertolli SC, Souza GM (2011) Tolerance to water deficiency between two soybean cultivars: transgenic versus conventional. *Ciência Rural*, v.31, p.373-378.
- Coelho MA, Fusconi R, Pinheiro L, Ramos IC, Ferreira AS (2018) The combination of compost or biochar with urea and NBPT can improve nitrogen-use efficiency in maize. *An Acad Bras Cienc* 90(2):1695–1703.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento – Safra 2018/19), v6, p. 1- 49, Disponível em:[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Safra 2018/19](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Safra%202018/19) (acessado dia 20 de 2020).
- Dhillon J, Torres G, Driver E, Figueiredo B, Andraun WR (2017) World phosphorus use efficiency in cereal crops. *Agron. J.* 109, 1670–1677.
- Embrapa. Sistema brasileiro de classificação de solos. 5.ed. Brasília: Embrapa, 2018. 590p.
- Ferreira DF (2019) Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, v.37, p.529-535.
- Frazão JJ, Silva AR, da Silva VL, da Oliveira VA, Corrêa RS (2014) Enhanced efficiency nitrogen fertilizers and urea in corn. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, p.1262-1267, 2014.
- Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Rodrigues WL, Fernandes GC, Boleta EHM, Neto M B, Biagini ALC, Baratella EB, De Souza JS (2018) Nitrogen rates associated with the inoculation of *Azospirillum brasilense* and application of Si: Effects on micronutrients and silicon concentration in irrigated corn. *Open Agriculture*; v .3, p. 510-523.

Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Santini JMK, Alves CJ, Nogueira LM, Ludkiewicz M GZ, Andreotti M, Bellote JLM (2016) Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, v. 40, n. 1, p. 015-36.

Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Santini JMK, Boleta EHM, Alves Rodrigues WL (2020) Macronutrient accumulation in wheat crop (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen doses and sources. Journal of Plant Nutrition, 43: 8, 1057-1069.

Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Rodrigues WL, Santini JMK, ALVES CJ (2019) Nitrogen fertilization efficiency and wheat grain yield affected by nitrogen doses and sources associated with *Azospirillum brasilense*. Acta Agriculturae Scandinavica Seção B - Ciência dos solos e plantas 69: 606-17.

Guo W, Nazim H, Liang Z, Yang D (2016) Deficiência de magnésio nas plantas: um problema urgente. A colheita Diário. v. 4, n 2: p.83-91.

Hungria M (2011) Inoculation with *Azospirillum brasilense*: Innovation in yield at low cost. Londrina: Embrapa soja. v.37 p.325.

KLAR, AE, VILLA NOVA, NA, MARCOS ZZ, CERVELLINI, A (1966) Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, v.23, p.15-30.

Jackson ML (1965) Soil chemical analysis. Prentice Hall, 498p.

Jadoski CJ, Rodrigues JD, De Oliveira Guilherme D, Ono EO, Marques RR, Jadoski SO (2016) Physiological Assessments of Sweet Sorghum Inoculated with *Azospirillum brasilense* according to Nitrogen Fertilization and Plant Growth Regulators. V. 2, p. 1-11.

Leite RC, Santos AC, Santos JGD, Leite RC, Oliveira LBT, de Hungria M (2019) Mitigation of Mombasa grass (*Megathyrsus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 43, p.1-14.

Liu Z, Zhu K, Dong S, Liu P, Zhao B, Zhang J (2017) Effects of integrated agronomic practices management on root growth and development of summer maize. European Journal of Agronomy, 84, 140-151.

Lollato RP, Figueiredo BM, Dhillon JS, Arnall DB, RAun WR (2019) Wheat grain yield and grain-nitrogen relationships as affected by N, P, and K fertilization: a synthesis of long-term experiments. Field Crops Res. 236, 42-57.

Longhini VZ, De Souza WCR, Andreotti M, Soares NA, Costa NR (2016) bacteria inoculation and diazotrophic nitrogen coverage fertilization in irrigated corn. Revista Caatinga, Mossoró, v. 29, n. 2, p. 338-347.

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira AS (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações (2nd ed., p. 319). Piracicaba: Potafos.

Manunza B, Deiana S, Pintore ME, Gessa C (1999) The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N - (N-butyl) - phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Solo Biol. Boicem* 31: 789-796.

Marschner P (2012) *Marschner's Mineral Nutrition Of Higher Plants*, 3rd Edn, New York, NY: Academic Press.

Martins MR, Jantalia CP, Reis VM, Döwich I, Polidoro JC, Alves BJR, Bode RM, Lorquiana, (2018) Impacto of plant growth-promoting bacteria on grani yield, proteína content, and urea-15 N remover by maize in a Cerrado Oxido. *Plant and soil.* v. 422, p.239-250.

Morais TP, Brito CH, Ferreira AS, Luz JMQ (2015) Morphophysiological aspects of maize plants and soil biochemistry due to nitrogen fertilization and maize seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Ceres*, v.62, p. 507-514.

Nor. MA (2017) Nitrogen management and regulai-o for oprimem NUE in maize – A mini revide Cogente Food; Agriculture, 3, 1348214.

Oliveira IJ, Fontes JRA, Barreto JF, Pinheiro JAC (2018) Recomendações técnicas para o cultivo de milho no Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (endoteca-e).

Oliveira IJ, Fontes JRA, Pereira BFF, Muniz AW (2018) Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increpasses maize yield. *Cem. Biol. Techno. Agric.* 5: 6.

Pereira NCM, Galindo FS, Gazola RPD, Dupas E, Rosa PAL, Mortinho ES (2020) Corn Yield and Fósforos Use Efficiency Response to Fósforos Rates Associated With Plant Growth Promoting Bacteria. *Fronteiras in Environmental Science*, v. 8, p. 40.

Petear CC, Teixeira Filho MCM, Galindo FS, Buzetti S, Mal monge JA, Mal monge LF (2019) Orgânica polmes with dissolve urea and nitrogen rates in maize. *Revista Ciências Agrária.* v. 62, p. 1 - 9.

Peters JB (2005) Wisconsin procedures for soil testing, plant analysis and feed e forage analysis: Plant analysis. Department of Soil Science, colege of agriculture and life sciences, Universit yof Wisconsin Extension, Madson. [https://uwlab.soils.wisc.edu/wpcontent/uploads/sites/17/2015/09/plant ic p.pdf](https://uwlab.soils.wisc.edu/wpcontent/uploads/sites/17/2015/09/plant%20analysis.pdf)> Acesso em 20/06/2020.

Ritchie SW, Hanway JJ, Benson GO (1993) How a corn plant develops. Ames, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service. 21p. (Special Report, 48).

Silva F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

Souza EM, Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Silva PR, Santos AC, Fernandes GC (2019) Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield? *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 23 n. 1 p. 53–59.

Teixeira CM, Carvalho GJ, Silva CA, Andrade MJB, Paes JMV (2010) bean mineral nutrition influenced by nitrogen and straws of millet and millet plus *Crotalaria juncea* intercropping *Fazu em Revista*, 7:73-79.

Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Andreotti M, Benett, CGS, Arf osá ME (2014) Wheat Nitrogen Fertilization Under no Till on the Low Altitude Brazilian Cerrado. *Journal of Plant Nutrition*. V. 37, p. 1732-48.

Vasconcelos ACP, Siqueira TP, Lana RMQ, Faria MV, Nunes AA, Lana AMQ (2016) Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and N fertilization of corn in the Cerrado biome. *Revista Ceres, Viçosa*, v. 63, n.5, p. 732-740.

Vettorazzi J, Filho MCT, Galindo FS, Dupas E, Yano ÉH, Buzetti S (2019) Does the Nitrogen Rates, Methods and Times of Application Influences the Corn Nutrition and Yield? *Journal of Agricultural Science*, v.11, n1.

Tabela 9- Análise físicas e químicas do solo, antes da semeadura do milho.

Prof. (cm)	N-total kg ha ⁻¹	pH CaCl ₂	MO g dm ⁻³	C mg dm ⁻³	P mg dm ⁻³	K mmol _c dm ⁻³	Ca mmol _c dm ⁻³	Mg mmol _c dm ⁻³	Al %	H+Al mmol _c dm ⁻³	SB g kg ⁻¹
0-20	4960	5,4	36	21	127,2	1,5	48	11	0	29	124
	CTC mmol _c dm ⁻³	V %	Cu mg dm ⁻³	Fe mg dm ⁻³	Mn mg dm ⁻³	Zn mg dm ⁻³	B mg dm ⁻³	S mg dm ⁻³	Silte %	Argila %	Areia total g kg ⁻¹
	153	68	1,6	37	36,3	52	0,59	16	99	136	765

Tabela 10- Resumo da análise de variância aplicado no conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) na folha, colmo e raiz de híbrido de milho, em conformidade com as doses de nitrogênio (D), inoculação de *Azospirillum brasilense* (I) e fontes (F) nitrogenadas.

Causa de variação	GL	Quadrados médios																	
		Órgãos vegetativo																	
		Folha						Colmo						Raiz					
		Nutrientes (g kg ⁻¹)																	
		N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S
Fontes (F)	1	0.02 ^{ns}	0.06*	5.34 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	1.29 ^{ns}	0.84 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01*	0.11*	0.01 ^{ns}	20.98*	0.03*	0.01 ^{ns}
Inoculação (I)	1	0.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	3.84 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.04*	0.01 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.55 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01*	2.03 ^{ns}	0.01*	0.01 ^{ns}
Doses (D)	3	0.02 ^{ns}	0.13*	92.79*	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.03*	0.03*	7.88*	2.04*	0.13 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.09*	0.01*	0.07*	0.08*	2.85*	0.05*	0.54*
F x I	1	0.02 ^{ns}	0.04*	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.04*	0.27 ^{ns}	1.42 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.21*	0.01 ^{ns}	0.02*	0.01 ^{ns}	13.51*	0.01 ^{ns}	0.04*
F x D	3	0.01 ^{ns}	0.03*	2.78 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.03*	0.01*	0.01 ^{ns}	1.07 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.33*	0.09 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.04*	0.01*	2.54 ^{ns}	0.01*	0.01*
I x D	3	0.03 ^{ns}	0.01 ^{ns}	2.92 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01*	0.01 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.02*	0.02*	1.55 ^{ns}	0.01*	0.01*
F x I x D	3	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	6.48*	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01*	0.01 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01*	0.01*	4.12*	0.01*	0.01 ^{ns}
Blocos	3	0.03 ^{ns}	0.01 ^{ns}	9.81*	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.37 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	1.41 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}
Resíduo	45	0.02	0.01	2.21	0.01	0.01	0.01	0.01	0.76	0.39	0.07	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Média	-	9.8	3.2	10.3	3.2	1.7	0.7	3.1	3.1	6.6	2.6	2.7	0.3	6.2	1.3	2.3	1.5	0.8	0.7
CV (%)	-	5.9	8.9	17.6	1.1	21.4	20.4	10.9	23.9	25.9	17.7	18.2	16.4	2	11.2	4	7.1	23.1	15.1

ns: não significativo, *: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, CV: coeficiente de variação.

Tabela 11- Desdobramento da interação fontes x inoculação x doses, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca) na folha e teor de potássio (K), fósforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) na raiz de híbrido de milho na ausência e presença da inoculação com *Azospirillum*

Nutrientes (g kg ⁻¹)	Órgãos vegetativo	Fonte de N	<i>Azospirillum brasilense</i>	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
				0	60	120	180				
K	Folha	Ureia	Ausência	12.6	10.6	8.1	7.5	y=-0.0295x+12.4	0.95	-	-
			Presença	14.2	10.8	8.6	7.4	y=-0.0373x+13.657	0.95	-	-
		Inibidor	Ausência	16.5	9.2	7.9	8.0	y=0.0005x ² -0.1371x+16.276	0.98	6.80	137.10
			Presença	13.7	10.9	10.8	8.4	y=-0.0269x+13.403	0.91	-	-
S	Folha	Ureia	Ausência	0.8	0.7	0.6	0.7	y=0.00001x ² -0.0021x+0.8136	0.94	0.70	105.00
			Presença	0.9	0.7	0.7	0.7	y=0.00001x ² -0.0029x+0.9083	0.80	0.69	145.00
		Inibidor	Ausência	0.8	0.7	0.7	0.7	y=-0.0006x+0.8106	0.59	-	-
			Presença	0.8	0.7	0.9	0.7	y=0.8165	-	-	-
K	Raíz	Ureia	Ausência	2.8	2.1	2.1	1.6	y=-0.0061x+2.765	0.86	-	-
			Presença	3.6	3.0	2.0	1.4	y=-0.000006x ² -0.0117x+3.6961	0.98	3.69	0.00
		Inibidor	Ausência	3.5	1.7	1.5	1.8	y=0.0001x ² -0.0349x+3.5284	0.97	1.40	121.30
			Presença	2.8	2.4	2.7	1.3	y=-0.00007x ² +0.0048x+2.7818	0.80	2.80	34.20
P	Raíz	Ureia	Ausência	1.2	1.3	1.3	1.1	y=-0.00002x ² +0.0031x+1.2465	0.99	1.30	77.50
			Presença	1.3	1.4	1.2	1.3	y=1.3446	-	-	-
		Inibidor	Ausência	1.7	1.3	1.2	1.0	y=-0.0036x+1.6847	0.91	-	-
			Presença	1.4	1.4	1.1	1.1	y=-0.0022x+1.4976	0.86	-	-
Mg	Raíz	Ureia	Ausência	0.7	0.8	0.8	0.7	y=-0.000007x ² +0.0013x+0.7973	0.99	0.85	92.85
			Presença	0.8	0.9	0.8	0.6	y=-0.00002x ² +0.002x+0.8872	0.98	0.93	50.00
		Inibidor	Ausência	0.9	0.9	0.8	0.7	y=-0.0015x+1.0067	0.98	-	-
			Presença	0.9	0.9	0.8	0.8	y=-0.001x+0.9921	0.75	-	-
Ca	Raíz	Ureia	Ausência	1.4	1.5	1.4	1.3	y=1.4615	-	-	-
			Presença	1.6	1.5	1.3	1.2	y=-0.000007x ² -0.001x+1.6285	0.94	1.60	71.40
		Inibidor	Ausência	1.7	1.6	1.5	1.4	y=-0.0016x+1.763	0.95	-	-
			Presença	1.6	1.5	1.5	1.4	y=-0.0009x+1.648	0.88	-	-

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

Tabela 12- Desdobramento do efeito das doses de nitrogênios, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de nitrogênio (N), fosforo (P), potássio (K) e enxofre (S) no colmo do milho submetido a diferentes doses nitrogenadas.

Nutrientes (g kg ⁻¹)	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet	
	0	60	120	180					
N colmo (g kg ⁻¹)	2.69	3.02	3.30	3.43	y = 0.0042x + 2.7428	0.96	-	-	
P colmo (g kg ⁻¹)	3.91	3.14	2.71	2.82	y = 0.00006x ² - 0.017x + 3.9217	0.99	2.71	-	141.66
K colmo (g kg ⁻¹)	8.51	6.29	6.68	5.09	y = -0.0164x + 8.1286	0.80	-	-	
S colmo (g kg ⁻¹)	0.32	0.31	0.36	0.36	y = 0.0003x + 0.3173	0.61	-	-	

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica

Tabela 13- Resumo da análise de média da interação fontes x inoculação, em conformidade com ausência e presença de *Azospirillum brasilense* em semente de milho, na concentração de nitrogênio (N) no colmo, de fosforo (P) na folha, de enxofre (S) no colmo, de enxofre (S) na raiz, em plantas de milho (g kg⁻¹.)

Fontes de N	<i>Azospirillum brasilense</i>	Órgãos vegetativo			
		Folha	Colmo		Raíz
		Nutrientes (g kg ⁻¹)			
		P	N	S	S
Ureia	Ausência	2.95±0.46 Bb	2.88±0.72 Ba	0.32±0.07 Ab	0.73±0.15 Bb
	Presença	3.26±0.42 Aa	3.18±0.63 Aa	0.37±0.06 Aa	0.76±0.13 Aa
Inibidor	Ausência	3.40±0.65 Aa	3.40±0.75 Aa	0.36±0.07 Aa	0.77±0.16 Aa
	Presença	3.32±0.53 Aa	3.01±0.65 Aa	0.32±0.07 Ba	0.71±0.13 Bb

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de fonte de N (ureia e inibidor de urease - NBPT sob mesmo tratamento de inoculação) e letras minúsculas entre tratamentos de inoculação (ausência e presença de *Azospirillum brasilense* sob mesma fonte de N) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (P<0.05). Valores descritos correspondem às médias de 4 repetições e Desvio Padrão.

Tabela 14- Desdobramento da análise de variância com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de enxofre (S) na raiz em híbrido de milho, submetida à ausência e presença de *Azospirillum brasilense* e a dose de nitrogênio.

Nutriente	<i>Azospirillum brasilense</i>	Dose (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
		0	60	120	180				
S na raiz (g kg ⁻¹)	Ausência	0.95	0.79	0.67	0.56	y = -0.0021x + 0.9412	0.99	-	-
	Presença	0.86	0.84	0.67	0.56	y = -0.000006x ² - 0.0006x + 0.8706	0.96	0.88	50

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

Tabela 15- Desdobramento da interação fontes x doses, com equação de regressão e estimativa da máxima eficiência técnica, aplicada na concentração de nitrogênio (N) na raiz, fosforo (P) na folha, cálcio (Ca) no colmo, magnésio (Mg) na folha, enxofre (S) na raiz em semente de híbrido de milho submetida a diferentes fontes de nitrogênio.

Nutrientes (g kg ⁻¹)	Orgãos vegetativos	Fontes de N	Doses (kg ha ⁻¹)				Equação	R ²	Ymet	Nmet
			0	60	120	180				
P	Folha	Ureia	3.46	3.11	2.8	3.02	$y=0.00004x^2-0.0098x+3.4891$	0.94	2.88	122.5
		Inibidor	4.15	3.19	3.17	2.9	$y=0.00005x^2-0.0149x+4.0951$	0.91	2.98	149.0
Ureia		1.64	1.64	1.69	1.87	$y=1.7131$	-	-	-	
Inibidor		1.88	1.78	1.92	1.64	$y=1.8091$	-	-	-	
Ca	Colmo	Ureia	2.41	2.28	2.98	2.88	$y=0.0035x+2.3272$	0.62	-	-
		Inibidor	2.57	2.66	2.57	2.8	$y=2.6541$	-	-	-
N	Raíz	Ureia	7.28	7.07	6.29	5.68	$y=-0.0093x+7.4236$	0.95	-	-
		Inibidor	6.61	5.92	5.8	5.48	$y=-0.0059x+6.4831$	0.9	-	-
Ureia		0.90	0.83	0.65	0.59	$y=-0.0019x+0.913$	0.96	-	-	
Inibidor		0.90	0.81	0.7	0.54	$y=-0.000005x^2-0.0012x+0.9046$	0.99	0.97	120.0	

R² - coeficiente de determinação; Ymet – valor estimado da máxima eficiência técnica; Nmet – dose de nitrogênio pela máxima eficiência técnica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

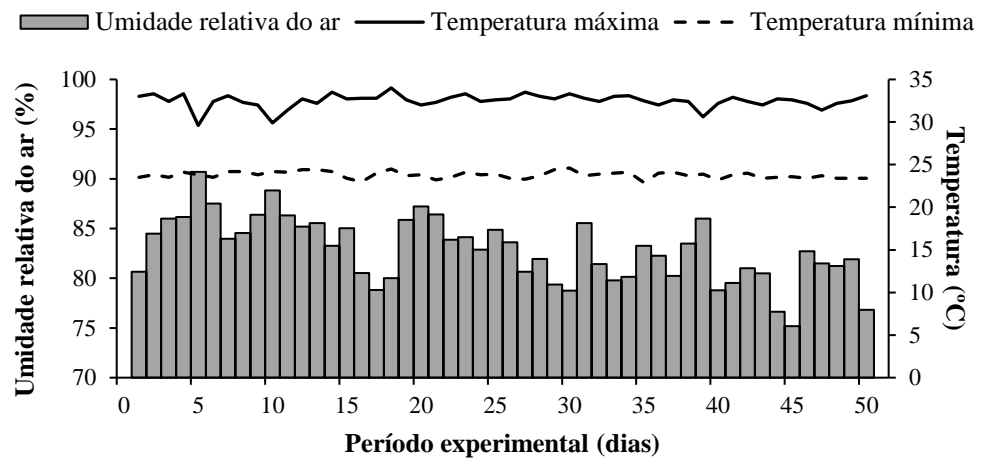


Figura 1 -Umidade relativa do ar, temperaturas máximas e mínimas da área experimental, durante o período de condução do experimento no ano de 2019, em Belém, Pará, Brasil

4 CONCLUSÕES GERAIS

A inoculação com *Azospirillum brasilense*, assim como doses de nitrogênio promoveu melhoria no diâmetro do colmo, fotossíntese, condutância estomática, transpiração e relação carbono interno externo, além disso, o tratamento com inibidor de urease – NBPT resultou em maior diâmetro de colmo, transpiração, relação Ci/Ca e clorofila a, clorofila b, clorofila total e antocianina.

A dose de 120 kg ha⁻¹ de N associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu maior número de folhas, massa seca da folha, massa seca da parte aérea, massa seca total, além de melhora na fotossíntese e condutância estomática, sendo a mais eficiente em termo de produção vegetativa do híbrido de milho.

As doses de N influenciaram positivamente a concentração de N, P, S no colmo do milho, enquanto a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu maior concentração de N no colmo, Ca e Mg na raiz. De maneira geral, o tratamento de semente com *Azospirillum brasilense* na dose de 180 kg ha⁻¹ de N, proporcionou maior concentração de macronutrientes no milho, independentemente das fontes aplicadas.