

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGROECOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL - PROFAGROEC

ANDRÉIA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE VARIEDADES DE MILHO PIPOCA E CANJICA EM ÉPOCAS
DIFERENTES DE APLICAÇÃO DE INOCULANTES EM CULTIVO ORGÂNICO**

MARINGÁ - PR
2018

ANDRÉIA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE VARIEDADES DE MILHO PIPOCA E CANJICA EM ÉPOCAS
DIFERENTES DE APLICAÇÃO DE INOCULANTES EM CULTIVO ORGÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Mestrado Profissional, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Carlos Alberto Scapim

MARINGÁ - PR
2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e sua presença em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim pela orientação, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, pela doação dos inoculantes e pela contribuição profissional.

Aos meus pais Mário e Maria e irmãs, Ana Paula, Marcela e Juliana, meus cunhados Alisson, Alex e Jefferson pela ajuda financeira para a realização deste trabalho, carinho e incentivo em todos os momentos.

À minha afilhada Heloísa, por todo carinho.

À minha segunda família que me acolheu em Maringá João e Lenita Guedes, meus “irmãos” Augusto e Amanda, pela companhia, carinho, incentivo e amizade.

Aos meus amigos, em especial aos colegas do grupo de melhoramento de milho especiais da UEM, pelo companheirismo, troca de experiências, e por deixarem as idas para FEI muito mais agradável e divertida.

À minha amiga Alessandra por estar comigo em todos os momentos. Sem sua ajuda não teria conseguido.

Aos meus amigos Joanes e Daniele da empresa Agromaj por todo suporte fornecido.

A empresa UPL, em especial ao Bruno pela doação do Azamax utilizado em todo experimento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA.

RESUMO

Os sistemas de agricultura orgânica têm os nutrientes fornecidos por bioinoculantes de subprodutos de plantas de animais e produtos à base de composto, como compostos de minhoca de adubos verdes. No entanto os parâmetros quantitativos e qualitativos das correções do solo dependem de suas fontes de onde geralmente não são suficientes para suprir as necessidades nutricionais das culturas de milho, e o milho especial requer altos níveis de nitrogênio (N). O presente trabalho teve como objetivo investigar variedades especiais de milho fornecidas com inoculantes microbianos aplicados em dois métodos de inoculação. Esses tratamentos fatoriais foram comparados com suas testemunhas (variedades sem inoculação), e investigou-se a interação entre esses fatores. Os ensaios foram realizados durante a safra 2017/2018 na Universidade Estadual de Maringá. O experimento com milho pipoca seguiu o delineamento de blocos casualizados onde o fatorial $3 \times 2 \times 2 + 3$ com cinco repetições. O ensaio com milho canjica seguiu o fatorial $2 \times 2 + 2$ com três repetições. Ambos ensaios tiveram variedades de milho e duas espécies de inoculantes microbianos (*Azospirillum brasilense* e *Methylobacterium sp*) aplicados em dois métodos de inoculação (semente e pulverização foliar no estágio V4 de desenvolvimento da planta). As características de resposta foram a produtividade de grãos e os componentes da cultura. Em ambos os ensaios, verificamos que a maioria das interações entre os fatores foi não significativa ($p > 0,05$), indicando a independência dos mesmos. Além disso, os inoculantes microbianos não tiveram efeitos benéficos sobre as características. A possibilidade de maior produtividade da cultura não confirmou a aplicação do inoculante no estágio V4. O composto orgânico pode ser o ponto chave para os tratamentos com inoculantes microbianos devido à disponibilidade de N nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta. As características também sugerem a necessidade de outros estudos sobre a influência de inoculantes microbianos na produção de milho especial.

Palavras Chave: agricultura orgânica, variedades de milho, bioinoculantes.

ABSTRACT

Organic agriculture systems have the nutrients supplied by plant or animal by-products bioinoculants, and compost-based products as earthworm composts and green manures. However, the quantitative and qualitative parameters of soil amendments depend on their sources from where they are generally not sufficient to supply the nutritional requirements of the maize crops, and specialty maize requires high levels of nitrogen (N). Thus, the current had the aim of investigating specialty maize varieties supplied with microbial inoculants at applied in two inoculation methods. These factorial treatments were compared with their checks (varieties without inoculation), and we also investigate the interaction among these factors. The trials were carried out during the growing season 2017/18 in the State University of Maringá. The popcorn trial followed the randomized complete blocks design where the factorial $3 \times 2 \times 2 + 3$ had five replications. The trial with white grits maize followed the same experimental design but the factorial scheme was $2 \times 2 \times 2 + 2$ with three replications. Both trials had maize varieties and two species of microbial inoculants (*Azospirillum brasilense* and *Methylobacterium* sp.) applied in two inoculation methods (in the seeds and the foliar spray at V4 stage of plant development). The response traits were grain yield and the components of crop production. In both trials, we verified that the majority of the interactions among the factors were non-significant ($p > 0.05$), indicating the independence of them. Furthermore, the microbial inoculants had no beneficial effects on the traits. The possibility of higher crop yield did not confirm the application of the inoculant in the stage V4. The organic compost may be the key point mitigating the treatments with microbial inoculants because of the availability of N in the first stages of the plant development. The traits also suggest the necessity of more trials about the influence of microbial inoculants on specialty maize production.

Keywords: green agriculture, varieties maize, bioinoculants.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Maximum and minimum daily temperatures and rainfalls along the experimental period; Maringá, 2017-2018.....	28
--	----

LISTA DE TABELAS

Table 1. Results from the soil chemical analysis.....	28
Table 2. Chemical analysis of the laying hen manure.....	29
Table 3. Analysis of variance of eleven traits in the popcorn crops: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN); stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grain (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018.....	31
Table 4. Estimates of contrasts from stalk diameter (SD) and grain yield (Y)	32
Table 5. Means from the t-test (LSD) discriminating eight traits of popcorn: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018	34
Table 6. Means from the inoculation methods of the following traits of popcorn: ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018.....	35
Table 7. Analysis of variance for ten traits of white grits maize: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grains (B100) from the trail in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018.....	35
Table 8. Means of varieties for the following traits in crops of white grits maize: plant height (PH), ear height (EH), ear diameter (ED), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Agroecologia	3
2.2. Cultura do milho	4
2.3. Milho pipoca	6
2.3.1. Origem e Características	6
2.3.2. Aspectos Econômicos	8
2.4. Milho canjica	9
2.4.1. Origens e características	9
2.4.2. Aspectos Econômicos	10
2.5. Inoculantes	11
2.5.1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal	11
2.5.2. Gênero <i>Azospirillum</i>	13
2.5.3. Gênero <i>Methylobacterium</i>	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2	25
METHODS OF INOCULATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA IN SPECIALTY MAIZE GENOTYPES UNDER AN ORGANIC AGRICULTURE SYSTEM.....	25
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	26
MATERIAL AND METHODS	28
RESULTS AND DISCUSSION.....	31
CONCLUSION	37
REFERENCES	38
Diretrizes para Autores	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho é o cereal mais produzido no mundo, cuja estimativa de produção foi de 1,10 bilhões de toneladas na safra de 2019/2020 (USDA, 2019). Os maiores produtores mundiais de milho, segundo o levantamento do USDA (2019), são os Estados Unidos, a China e o Brasil, sendo que o Brasil apresentou uma estimativa de produção de 98.389,9 mil toneladas de grãos de milho, para a safra 2019/2020, em uma área total cultivada de 17.537 mil hectares (CONAB, 2019).

Diversas são as variedades de milho cultivadas no Brasil. Dentre elas destacam-se o milho pipoca (*Zea mays everta*) e o milho canjica (*Zea mays saccharata*), ambos de extrema importância econômica. Esses tipos de milho são conhecidos como “milhos especiais” e apresentam ampla aceitação nos mercados. O milho-pipoca é visto como uma cultura de elevada rentabilidade, garantindo altos ganhos econômicos nos múltiplos ramos da cadeia produtiva (RANGEL et al., 2011). Ao passo que o milho canjica é obtido por moagem a seco (GONÇALVES et al., 2003) e sua produção, geralmente de grãos de coloração branca, é utilizada na alimentação humana e animal (SOUZA et al., 2009).

Visando a produtividade e o aumento nutricional, o nitrogênio (N) vem sendo uma fonte bastante utilizada no desenvolvimento de culturas não leguminosas, pois é o nutriente mais absorvido e extraído da cultura de milho (Sousa & Lobato, 2004). Na Agricultura orgânica, prioriza-se o não uso de produtos químicos, com isso a fonte de nitrogênio necessária para o desenvolvimento das culturas necessita de uma alteração, principalmente no caso das gramíneas.

O milho orgânico poderá, a médio e longo prazo, atingir tanto o mercado nacional quanto internacional de produtos orgânicos certificados. Para isto tornar-se realidade, há a necessidade de maior produção de milho no sistema orgânico com a conversão de médias e até de grandes propriedades para este sistema produtivo (LIU et al., 2013).

Como alternativa para suprir a demanda de Nitrogênio na planta, utilizam-se vários fertilizantes sintéticos, principalmente os de fácil absorção, como a ureia. Entretanto, esses fertilizantes não apresentam um resultado satisfatório para as plantas. Silva et al. (2009), relataram que a ureia tem aproveitamento de 42% a 49% devido às perdas de N para o ambiente, as quais podem ocorrer por imobilização microbiana (SOUSA & LOBATO, 2004).

Umas das alternativas para redução do consumo de fertilizantes sintéticos, pela cultura do milho, são as bactérias diazotróficas e as bactérias endofíticas (essas, até então, pouco conhecidas), as quais são capazes de fixar o N atmosférico e disponibilizá-lo para as plantas, por meio de uma associação simbiótica, em que ocorre a colonização da rizosfera pelas bactérias e não há penetração delas nos tecidos radiculares (PANDOLFO et al., 2015).

O uso de inoculantes, em cultivo orgânico, vem se destacando, pois, estes produtos além de fixar o nitrogênio, também contribuem para o desenvolvimento vegetal por meio dessas bactérias que promovem o crescimento das plantas (BPCP). Em contato com o N₂ (gasoso), presentes nos espaços porosos do solo, as BPCP realizam a quebra de moléculas, por enzimas, caracterizando a fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

Entre os gêneros capazes de se associar as raízes de gramíneas estão o *Azospirillum* e o *Metylobacterium*. As bactérias do gênero *Azospirillum* possuem uma eficiência quanto à fixação biológica de N até 78% maior que outros gêneros encontrados juntos às raízes desse grupo de plantas (KUSS et al., 2007). Enquanto que as bactérias do gênero *Metylobacterium* são descritas na literatura como promotoras de crescimento vegetal e fixadoras de N₂ (BENT e CHANWAY, 1998).

Há relatos de que produtores de milho geralmente inoculam a bactéria diretamente na semente, ou por aplicação em sulco de semeadura, dentre esses, a sua utilização no sulco demonstra ser mais viável (ZILLI et al., 2010). Nesse contexto, este estudo teve como objetivo analisar a interação dos inoculantes com as variedades de milho pipoca e canjica em diferentes épocas de aplicação, visando possibilitar ao agricultor uma maior produtividade no sistema de cultivo orgânico.

CAPÍTULO 1

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Agroecologia

A agroecologia, mais do que simplesmente tratar sobre o manejo ecologicamente responsável dos recursos naturais, constitui-se em um campo do conhecimento científico que, partindo de um enfoque holístico e de uma abordagem sistêmica, pretende contribuir para que as sociedades possam redirecionar o curso alterado da coo evolução social e ecológica, nas suas múltiplas inter-relações e mútua influência (CAPORAL et al., 2006).

Para Altieri (2001), a agricultura orgânica tem como objetivo de estabelecer relações ecológicas e o sinergismo biológico em ambientes agrícolas complexos favorecendo a fertilidade do solo e elevando ao máximo a produtividade e a proteção das culturas. Diante deste conceito simplista de que a agricultura orgânica é somente aquela que não utiliza produtos químicos sintéticos e o substitui por produtos naturais (ASSIS et al., 1995).

O desafio, segundo Altieri et al., (1996) é realizar um manejo que aumente a população de organismos que melhorem os processos biológicos no ambiente agrícola, enquadrando-se na ideia de Hess (1980) de que a natureza é completa e complexa e que o homem deve integrá-la harmoniosamente e não a tratar como se fosse um espoliador ou dono.

Ao possibilitar vários benefícios a agricultura orgânica representa 84,4 % das propriedades rurais brasileiras. Mas apenas 24,3% das áreas agrícolas utilizam a mão de obra familiar, pois apresentam poucos recursos para compra de insumos externos, além da tradição de reservarem sementes para o próximo plantio (FRANÇA et al., 2009).

Os consumidores, por sua vez, estão se tornando mais conscientes, buscando produtos mais saudáveis e de qualidade, gerando uma forte demanda por orgânicos.

O milho é um cereal utilizado tanto na alimentação humana, na forma de óleo, farinhas e grãos verdes, como na alimentação animal. A importância do milho na

alimentação animal é grande, pois cerca de 80% da produção é utilizada nas cadeias de produção de carnes, ovos e leite, como componente energético de rações e silagens.

Na cadeia produtiva de milho no Brasil, estima-se que o milho orgânico represente apenas 0,03% da produção nacional desse cereal na safra 2015/2016, segundo o IBD Certificações. O 12º levantamento da safra brasileira de grãos liberado pela Companhia Nacional de Abastecimento – Conab¹, em setembro de 2016, registrou a produção de 66,9 milhões de toneladas de milho na safra 2015/2016. Portanto, a produção estimada de milho orgânico é de cerca de 20 mil toneladas (CONAB, 2016).

O milho produzido organicamente é um produto diferenciado e apresenta características químicas distintas quando comparadas ao milho convencional. Geralmente, os teores de β -caroteno são maiores e conferem uma cor mais avermelhada, além de maiores teores de proteínas, lipídeos, cinzas e fibras e menor teor de carboidratos. As espigas de milho verde apresentam menor teor de acidez e menores valores de carboidratos redutores e amido (KOKUSKA, 2005).

2.2. Cultura do milho

O milho é provavelmente originário do México, cujo sítio Arqueológico mais antigo que foi encontrado este cereal, situa-se no Vale de Tehuacan com cerca de 7.000 anos de idade. A inflorescência fêmea deste milho com idade de mais de 5.000 anos antes de Cristo tinha um elevado grau de especialização o que exclui a possibilidade de serem disseminadas suas sementes por via natural, portanto o milho mais antigo que se tem notícia/registro já dependia de humanos para sua sobrevivência (BENSON e PEARCE, 2003)

Pertencente à espécie *Zea mays* L., família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*. Este apresenta aproximadamente 100% de fecundação cruzada, sendo uma cultura alógama (PATERNIANI e CAMPOS, 2005).

Para Paterniani e Goodman (1977) a grande diversidade genética encontrada na espécie de *Zea mays* L., sem dúvida pode ser considerada um exemplo de evolução, uma vez que corresponde a mudanças nas frequências genéticas ao longo das gerações. Os fatores que contribuem para estas mudanças são seleção, mutação,

oscilação genética, migração e hibridação. Provavelmente todos os fatores desempenham papel maior ou menor no desenvolvimento do milho.

Sendo a espécie comercial mais importante, com origem nas Américas sendo atualmente politípica. Trata-se de uma cultura completamente disseminada por todo o mundo, apresentando raças e variedades específicas, adaptadas às distintas condições econômicas (PATERNIANI e CAMPOS, 1999).

A cultura do milho possui importância expressiva no cenário agrícola mundial, dada à extensão de suas áreas cultivadas, por suas inúmeras formas de utilização e por seu grande papel sócio econômico (GALVÃO et al., 2014).

Segundo dados da FAO (Food Agriculture Organization), o milho é o cereal mais produzido no mundo, com estimativa de produção de 1.011,07 bilhão de toneladas para o ano agrícola de 2016/2017 (FAO, 2016).

O Brasil produz anualmente 83.817,9 mil toneladas de grãos de milho em uma área cultivada de 15.922,5 mil hectares, considerado o segundo grão mais cultivado no território brasileiro, além de ocupar posição de destaque no cenário internacional como o terceiro maior produtor mundial, superado apenas pelos Estados Unidos da América e China (CONAB, 2016).

Dentre os maiores produtores de milho no mundo, podemos citar os Estados Unidos, China, em terceiro lugar, Brasil. No país, a produção agrícola é amplamente difundida, podendo haver diferenças de região para região, dando destaque as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste que, diante do cenário nacional, destacam-se como a segunda maior área cultivada de milho, para safra 2017/18 o país pode chegar a exportar 34,0 milhões de toneladas, o que seria um recorde (CONAB, 2017).

O Paraná é principal produtor da Região Sul e o segundo maior do Brasil, contribuindo com aproximadamente 19% da produção nacional. Na Safra de 2016/17, o Paraná cultivou uma área de milho total de 2.917,0 mil hectares, na qual obteve uma produção de 17.837,8 mil toneladas e produtividade média de 6.115 kg ha⁻¹. Todavia, apesar do rendimento médio do Paraná ser aproximadamente 13% superior ao rendimento médio nacional, o mesmo ainda está muito aquém do potencial produtivo das cultivares (CONAB, 2016).

Para a safra 2016/17, a Embrapa Milho e Sorgo divulgou a disponibilidade de 315 cultivares de milho, sendo 214 cultivares transgênicas e 101 cultivares convencionais. Para usos especiais como canjica, pipoca, doce e para a indústria de

amido, o agricultor deverá verificar outras características que atendam às exigências do consumidor ou da indústria processador.

O cultivo de milho tradicional é uma alternativa muito viável para a agricultura familiar, principalmente por não acessar às tecnologias recomendadas pelo agronegócio. Porém, alguns produtores familiares ainda utilizam sementes híbridas, reduzindo o lucro final, além de necessitarem de altas entradas de capital para o seu desempenho máximo aumentando ainda mais a dependência do agricultor com as empresas “proprietárias” desses pacotes tecnológicos (ABREU et al., 2007).

2.3. Milho pipoca

2.3.1. Origem e Características

A origem do milho pipoca é americana, mais precisamente do centro sul do México (DEOBLEY, 1990). Existem três fortes hipóteses quanto à origem genética do milho-pipoca:

(1) Goodman e Smith (1987) defendem a existência de evidências genéticas e citológicas que demonstram o parentesco entre o milho-pipoca e teosinte, pois apresentam facilidade de intercruzamento, originando descendentes geralmente férteis;

(2) Mangelsdorf et al. (1949) descrevem que o primeiro relato de descoberta do milho pipoca foi um exemplar com data estimada de 2500 a.C. encontrado no sítio arqueológico de “Bat Cave”, Novo México. Mangelsdorf (1974), avaliando descobertas arqueológicas de doze sítios, localizados no México e no Sudoeste dos Estados Unidos da América, detectou os milhos mais antigos como precursores das raças mexicanas de milho-pipoca Chapalote ou Nal-tel, não havendo indicativos de que o teosinte seja o genitor silvestre do milho;

(3) Erwin (1949) acredita que o milho-pipoca foi originado de uma mutação do milho comum (tipo duro “flint”). Porém, esta hipótese é pouco admissível, pois segundo Zinsly e Machado (1987) a característica de expansão é condicionada por vários genes. Paterniani e Viegas (1987) afirmam que nenhuma delas é passível e de aceitação definitiva. O milho-pipoca é uma cultura alógama, com aproximadamente 100% de fecundação cruzada (PATERNIANI e CAMPOS, 2005). Quando comparado

ao milho comum, o milho-pipoca apresenta menor produtividade. Isto se deve principalmente ao fato de a espiga ter grãos menores, a planta possuir menor vigor, ser mais prolífica, exibir maior incidência de pragas e doenças e portar um menor número de folhas.

Além disso, o milho-pipoca produz perfilhos com maior frequência, e dispõe de um sistema radicular menos desenvolvido, e sofre maior dano com o ataque de larvas de diabrotica e nematoides, sendo mais suscetível ao acamamento e à seca (GOODMAN e SMITH, 1987; ZINSLY e MACHADO, 1987; FANTIN et al., 1991). Outra característica interessante no milho-pipoca é que geralmente suas plantas são super precoces na maturação e na secagem dos grãos.

Sabe-se que hoje em dia a principal diferença entre o milho comum e o milho pipoca é a capacidade de expansão com o rompimento do pericarpo e a exposição do endosperma que acontece quando o grão de milho pipoca é aquecido em torno de 177°C, sofrendo uma pressão de 930,8kPa (HOSENEY e ZHANG., 1998).

A capacidade de expansão (CE) dos grãos de milho pipoca é a característica mais importante para o consumidor e, pode ser definida como a relação entre o volume de pipoca e o volume de grãos ou ainda a relação entre o volume de pipoca e o peso de grãos (ALEXANDER e CREECH, 1977). Quanto maior a capacidade de expansão, melhor é a qualidade da pipoca e, portanto, maior o seu valor comercial (MIRANDA et al., 2003). As variedades não-melhoradas têm índice de capacidade de expansão (ICE) entre 8 e 12, sendo 15 o valor mínimo recomendado para a comercialização (ZINSLY e MACHADO, 1987).

Danos no pericarpo, mesmo superficiais, podem ocasionar no grão, um menor suporte de pressão, afetando drasticamente a capacidade de expansão.

Os grãos de milho-pipoca podem variar quanto ao tamanho (de 0,5 a 1,0 cm), formato (redondo, chato ou pontiagudo) e coloração (branca, amarela, alaranjada, rosa, creme, vermelha, roxa, preta ou azul), sendo as cores branca e amarela as mais comuns. Os grãos de formato arredondado do tipo pérola, com endosperma amarelo alaranjado, são os que possuem maior aceitação comercial (ZINSLY e MACHADO, 1987; ZIEGLER e ASHMAN, 1994).

2.3.2. Aspectos Econômicos

O Brasil é o segundo maior produtor de pipoca, a cultura é de grande importância na economia do país, havendo a necessidade de produção de novos híbridos que reúnam características agronômicas desejáveis ao produtor e ao consumidor, uma vez que a demanda é crescente e o cultivo é rentável.

Entre os nomeados “milhos especiais” com ampla aceitação nos mercados consumidores, o milho-pipoca é visto como uma cultura de elevada rentabilidade, garantindo altos ganhos econômicos nos múltiplos ramos da cadeia produtiva (RANGEL et al., 2011). O grão de milho-pipoca possui em sua composição uma fração rica em lipídios e amido. Além de proteínas, fibras e vitaminas do complexo B, tem grande potencial calórico, sendo, portanto, rico em açúcares e gorduras (SAWAZAKI et al., 1986). Seu consumo pode trazer inúmeros benefícios à saúde.

Atualmente, apenas 75 cultivares de milho-pipoca estão registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Cerca de 81% destas foi desenvolvida por empresas empacotadoras de milho-pipoca (MAPA, 2016), que colocam acesso restrito de uso com os produtores parceiros. Tal fato impede seu uso por pequenos produtores, sendo necessário, assim, o desenvolvimento de novas cultivares por instituições públicas.

Apesar de poucas informações oficiais sobre o mercado de milho-pipoca, tanto no Brasil como no mundo, sabe-se que o estado do Mato Grosso é o maior produtor de milho pipoca do país, sendo responsável por 80% da produção nacional.

De acordo com informações coletadas junto a integrantes da cadeia produtiva no ano de 2017, este estado aumentou 266% da sua produção quando comparado ao ano de 2016. Na safra atual foram colhidas 303,722 mil toneladas, ante 82,975 mil (t) em 2016. A maior parte da área plantada é concentrada no município de Campo Novo do Parecis (IBGE, 2017).

2.4. Milho canjica

2.4.1. Origens e características

Um dos cereais mais cultivados no mundo, o milho, ocupa o segundo lugar perdendo apenas para o trigo. No Brasil, a cultura do milho, predomina em área cultivada e ocupação de mão obra, sendo de extrema importância para a economia brasileira, assim como o milho pipoca, o milho verde e o mini-milho, o milho canjica representa um nicho específico de mercado e é tido como uma alternativa de lucro para o agricultor.

Hoje em dia a canjica é um dos noventa derivados de milho, obtida por moagem a seco (GONÇALVES et al., 2003). A produção de canjica é o uso mais frequente do milho branco, seja para alimentação humana ou para alimentação animal (SOUZA et al., 2009).

A canjica nada mais é do que o grão de milho, do qual o gérmen foi extraído, tanto de forma total quanto parcial. Todas as outras variações, como cor de grão, quantidade de pericarpo e tegumento, tamanho do grão ou do pedaço de grão compõem a classificação da canjica (MAPA, 2016).

Obtém-se o milho canjica por meio do processo de germinação, podendo acontecer por via úmida ou seca ocorrer por via seca. No processo por via úmida, o grão do milho após o processamento é separado em três partes: endosperma (canjica), gérmen (parte do grão que contém o embrião) e pericarpo (pele que envolve o grão). No processamento por via seca, obtêm-se a canjica e o farelo, este constituído principalmente pelo gérmen e pericarpo (MAPA, 2016).

A Legislação Brasileira para canjica é representada pela Portaria nº 109 do Ministério da Agricultura, publicada no Diário Oficial da União em 28 de fevereiro de 1989. Embora a Lei nº 6.305, de 15 de dezembro de 1975, que amparava esta Portaria, tenha sido revogada pela Lei Nº 9972, de 25 de maio de 2000, a regulamentação da canjica em questão ainda é vigente.

Sabe-se que no Brasil a disponibilidade e recomendação de cultivares de milho branco para a produção de canjica é pequena, além da pouca quantidade de cultivares no mercado, a produção científica de trabalhos com milho branco enfatizando a produção de canjica em cultivo orgânico é escassa, justificando a necessidade de mais estudos.

2.4.2. Aspectos Econômicos

O milho é um produto que ocupa posição importante na economia global, sendo o segundo cereal mais produzido do mundo. A produção mundial de milho na safra de 2017/18, é estimada em 991,9 milhões de toneladas.

Os Estados Unidos é o maior produtor com 361,1 milhões de toneladas, seguidos pela China, com 215,5 milhões de toneladas, em terceiro lugar o Brasil, com 75 milhões de toneladas (USDA, 2018).

Dessa produção brasileira, não existem dados oficiais referentes ao milho branco. Segundo dados da EMBRAPA (2015), dentre 467 cultivares menos de 1% de cultivares de milho branco foram disponibilizadas para a safra 2014/15, representado pelas cultivares IPR 119, IPR 127, RS 21, Al Bianco e BR 451. A agroindústria responsável pela transformação do milho em diversos derivados utiliza o milho branco como fonte de matéria-prima para a indústria de alimentos.).

A semente de milho é, dentre todas as tecnologias agrícolas hoje empregadas no cultivo, a que mais se desenvolveu nos últimos tempos. Com os avanços da biotecnologia, houve grande impacto para a produção de milho no Brasil o que permite a sua flexibilidade de cultivo nas mais diferentes regiões e condições de clima e solo. Os avanços tecnológicos envolvem além do potencial genético visando produtividade (CONAB,2018).

Na Região Sul, maior produtora de milho primeira safra do país, a cultura apresentou a maior redução percentual na área plantada (19,6%), estimada agora em 1.377,4 mil hectares, contra os 1.712,9 mil hectares da safra passada. Com produtividades impactadas pela redução das precipitações, a produção deve atingir 10,3 milhões de toneladas, queda de 26,6%. No Paraná, a colheita da safra 2017/2018 já concluída. A produção chegou a 2,9 milhões de toneladas. O clima ameno durante o verão, com noites mais frias, foi um dos principais motivos para o bom desempenho da cultura, que apresentou rendimento de 8.748 kg/ha, na média (CONAB,2018).

2.5. Inoculantes

Os inoculantes são produtos biológicos compostos por bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP).

Esses microrganismos ao entrarem em contato com o N_2 (gasoso) presente nos espaços porosos do solo realizam a quebra das moléculas $N\equiv N$ pela enzima dinitrogenase e o reduz a amônia, caracterizando-se a fixação biológica de nitrogênio e ainda podendo estimular o crescimento das plantas por diversos mecanismos como a produção hormônios como a auxina, giberilina (DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000; RADWAN et al., 2002), citocininas (TIEN et al., 1979), etileno (STRZELCZYK et al., 1994).

A inoculação permite a redução de custos agrícolas e em casos como na agricultura familiar, em que os rendimentos são menores, pode-se nos melhores casos substituir totalmente os fertilizantes nitrogenados, sendo adequado o seu uso na agricultura orgânica.

2.5.1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Entre os microrganismos que habitam a rizosfera, um grupo heterogêneo de espécies bacterianas, conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), são capazes de promover o crescimento de raízes e parte aérea das plantas (HARTMANN et al., 2009; HUNGRIA et al., 2010). O termo BPCV foi utilizado pela primeira vez no final da década de 70 (KLOEPPER e SCHROTH, 1979), e, desde então, tem sido crescente o emprego destas bactérias em pesquisas visando a interação planta-microrganismos (VESSEY, 2003; BABALOLA, 2010). Atualmente as BPCV são chamadas de biofertilizadores, mesmo não havendo uma definição exata, mas o mesmo refere-se ao uso de microrganismos com o objetivo de aumentar a disponibilidade e captação de nutrientes minerais pelas plantas (VESSEY, 2003; BHATTACHARJEE et al., 2008; BABALOLA, 2010).

A grande maioria das BPCV são Gram-negativas e promovem diretamente o crescimento pela produção e liberação de hormônios vegetais, aumento da nitrato redutase, produção de ácido cianídrico, mineralização de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfatos inorgânicos, entre outros (CONN et al., 1997; GLICK e BASHAN, 1997; SPAEPEN et al., 2009). Além dos

efeitos diretos, as BPCV beneficiam as plantas por meio de efeitos indiretos, associados principalmente com a redução dos danos causados por fitopatógenos (VAN LOON, 2007; WELLER, 2007; SINGH et al., 2013; BASHAN et al., 2014). Diversos gêneros de BPCV apresentam associação com diferentes espécies de importância agrícola, dentre eles: *Azospirillum*, *Arthobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Streptomyces* (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; HUNGRIA et al. 2010; HELMAN et al., 2012; VIDEIRA et al. 2012;).

Dashti et al. (1998), por exemplo, relataram um efeito positivo no aumento do crescimento das plantas de 5 a 30% em diversas culturas como milho, algodão, lentilha, canola, e arroz, dentre outros, após o tratamento com BPCV.

As BPCV responsáveis pela FBN são denominadas de diazotróficas, sendo que estas bactérias codificam a enzima nitrogenase, a qual é um complexo responsável por catalisar a conversão do gás N₂ em amônia (SANTI et al., 2013).

A utilização mundial de fertilizantes nitrogenados está na ordem de 113 milhões de toneladas de N (FAO, 2016). Deste total, estima-se que aproximadamente 65% do N aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta através dos processos de emissão gasosa, escoamento, erosão e lixiviação (BHATTACHARJEE et al., 2008). Neste contexto, a utilização da fixação simbiótica de N tem grande impacto no que diz respeito a nutrição mineral de plantas como um componente integral do sistema agrícola sustentável, pois estima-se que a FBN contribua com aproximadamente 70 milhões de toneladas por ano no mundo (MITTER et al., 2013). Ainda, se 15% das áreas fertilizadas por ureia, adubo à base de N com melhor relação custo/benefício, fossem substituídas pela utilização de BPCV, seriam economizados cerca de 3,4 bilhões de dólares por safra, além de todos benefícios ambientais derivados da utilização destas bactérias (MONTEIRO et al., 2012).

Dessa forma, a interação das BPCV com os microrganismos presentes nos solos e na planta afeta a inoculação, o equilíbrio ou desequilíbrio dessas espécies podem gerar ganhos ou perdas.

2.5.2. Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* faz parte do grupo de microrganismos procariotos de vida livre, pertencente ao Reino Monera na subdivisão α Proteobacteria, na qual se encontram a maioria das bactérias Gram-negativas de formato vibrio ou espirilo. São bactérias diazotróficas de vida livre, que podem estar associadas a rizosfera das plantas, caracterizando uma colonização externa, ou associadas de forma endofítica, quando penetram nos espaços intercelulares das raízes (VAN DOMMELEN e VANDERLEYDEN, 2007).

Atualmente, 18 espécies de *Azospirillum* já foram identificadas: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. largimobile* (SLY E STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE E YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007A), *A. zeae* (MEHNAZ et al., 2007B), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008), *A. picis* (LIN et al., 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010), *A. formosense* (LIN et al., 2012), *A. palatum* (ZHOU et al., 2009), *A. humicireducens* (ZHOU et al., 2013) e *A. fermentarium* (LIN et al., 2013), sendo considerado um dos gêneros de BPCV mais estudados (CASSÁN E DIAZ-ZORITA, 2016).

As bactérias do gênero *Azospirillum*, quando associadas com as raízes das plantas, são capazes de promover o crescimento vegetal pela produção de aminoácidos, ácido indol-acético, giberelinas e outras poliaminas, o que favorece o crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, absorção de água e nutrientes do solo (TIEN et al., 1979; THULER et al., 2003; BASHAN e DE-BASHAN, 2010; DOORNBOS et al., 2012). Além destes benefícios, bactérias do gênero *Azospirillum* possuem capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico pelo processo de FBN e, dessa forma, podem contribuir diretamente para disponibilização de N para várias espécies não leguminosas (HUNGRIA ET AL., 2010).

De acordo com Steenhoudt e Vanderleyden (2000), a capacidade de conversão do N₂ atmosférico em amônio por essas bactérias, em condições micro aeróbicas e baixos níveis de N, é decorrente da ação do complexo nitrogenase. São dois os componentes que constituem este complexo: a proteína dinitrogenase ou proteína-MoFe (proteína ferro-molibdênio), que contém um sítio ativo de redução do

N₂, e a proteína dinitrogenaseredutase ou proteína-Fe (proteína ferro), responsável pela transferência de elétrons de um doador para a proteína nitrogenase (EADY, 1996).

As bactérias do gênero *Azospirillum* possuem grande potencial de uso na agricultura, face à capacidade que possuem de colonizar raízes de várias espécies de plantas, bem como na sua ampla distribuição geográfica (FADEL-PICHET et al. 1999).

2.5.3. Gênero *Methylobacterium*

O gênero *Metylobacterium* pertence ao Reino Monera, ordem Rhizobiales, família Methylobacteriaceae e sub classex-2 de Proteobactéria, possuindo mais de 28 espécies descritas, são Metitotróficas, facultativas, ou seja, são capazes de utilizar compostos de apenas um carbono como metanol e metilamina para seu crescimento (MADHAYAN et al. 2009).

As bactérias endofíticas podem ser classificadas como obrigatórias ou facultativas. As primeiras são estritamente dependentes de seu hospedeiro para crescer, sobreviver e serem transmitidas para outras plantas, verticalmente ou via vetores, enquanto que as bactérias endofíticas facultativas têm um estágio em seu ciclo de vida em que podem viver fora do hospedeiro, no ambiente (HARDOIM, VAN OVERBEEK e VAN ELSAS, 2008).

Encontram-se distribuídas em uma variedade de ambientes naturais incluindo o solo, ar, poeira, água doce e salgada, sedimentos ambientais e urbanos e plantas (ANDREOTE et al., 2006).

Dentro da planta, as bactérias endofíticas podem permanecer em estado de latência ou colonizar ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN, BENHAMOU e KLOEPFER, 1997a), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997; MAHAFFEE et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN e KLOEPFER, 1996).

Com essa colonização sistêmica, podem alterar condições fisiológicas, morfológicas do hospedeiro, agindo sobre a populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997; ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006).

Outro efeito atribuído às bactérias endofíticas é a promoção de crescimento vegetal (BENT e CHANWAY, 1998; HALLMANN et al., 1997), que pode ocorrer através da solubilização de fosfato (VERMA, LADHA e TRIPATHI, 2001), produção de fitohormônios (ácido indol-acético, citocinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno) (ZAKRAHOVA, 1999; KUKILNSKY-SOBRAI et al., 2004; LEE et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2005), fixação de N₂ (HALLMANN et al., 1997), ou ainda por meio da produção de sideróforos, uma vez que as bactérias são capazes de quelar o ferro presente no solo disponibilizando-o à planta (BURD, DIXON e GLICK, 1998). Vários outros efeitos benéficos relacionados à promoção de crescimento vegetal, tais como modificação da morfologia das raízes, ajustamento osmótico e aumento da eficiência.

A presença do gene da nitrogenase (*nifH*) já foi descrita em espécies deste gênero (SY et al., 2001), sugerindo a possibilidade destes organismos fixarem N₂, suprimindo a planta hospedeira com fontes orgânicas de nitrogênio. Esta interação foi reforçada também pela presença de genes envolvidos com a nodulação de plantas (gene *nodA*) em linhagens de *Methylobacterium* (SY et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.; CANSI, E.; JURIATTI, C. Avaliação do rendimento sócio-econômico de variedades crioulas e híbridos comerciais de milho na microregião de Chapecó. **Revista Brasileira Agroecológica**, v. 2, n.1, 2007.

ALEXANDER, D. E.; CREECH, R. G. Breeding special industrial and nutritional types. In: SPRAGUE, G. F.; FUCCILLO, D. A. (Ed.). Corn and corn improvement. **American Society of Agronomy**, Madison, p. 363-386, 1977.

ALTIERI, M. **Agroecologia, a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 3ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001 (Síntese Universitária, 54).

ANDREOTE, F. D.; GULLO, M. J. M.; LIMA, A. O. S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p.169-173, 2004.

ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; GAI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ASSIS, R. L., AREZZO, D. C. e De POLLI, H. Consumo de produtos da agricultura orgânica no Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Administração**, v. 1, p. 84-89, 1995.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, 32:1559-70, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, 108:77-136, 2010.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, 378:1-33, 2014.

BENSON, G. O.; PEARCE, R. B. Corn perspective and culture. In: WHITE, J. P.; JOHNSON, L. A. **Corn: chemistry and technology**. American Association of Cereal Chemists, 2ed., cap. 1, p. 1-33, 2003.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 44, p. 980-988, 1998.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80:199-209, 2008.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-romotion bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A.; PAULUS, G. **Agroecologia Matriz disciplinar ou novo paradigma para o desenvolvimento rural sustentável**. Brasília, DF. 2006.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**. 103:117-130, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2019/20: primeiro levantamento – outubro de 2019**. Brasília, DF. 2019, 114 p. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/12284-1-levantamento-safra-2019-20> > Acesso em: 28, outubro, 2019.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2016/17: décimo segundo levantamento**. Brasília, DF. 2016, 182 p. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf / > acesso em: 15 dez. 2017

CONAB. **Proposta de preços mínimos, safra 2016/2017**, ISSN: 2359-4160. Brasília, v. 2, n. 2, 2017.

CONN, K. L.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. 43:801-808, 1997.

DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R.; SMITH, D. L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions. **Plant and Soil**. 200:205-213, 1998.

DEOBLEY, J. F. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species, **Bioscience**, v. 40, p. 443-448, 1990.

DÖBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155-164, 1999.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: a review. **Agronomy for Sustainable Development**. 32: 227-243, 2012.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**. 96: 3013–3030, 1996.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 51: 17-26, 2001.

ERWIN, A. T. The origin and history of popcorn. **Agronomy Journal**. 41: 53-56, 1949.

FADEL-PICHET, C. M.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense* nifA gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, 179: 281-288, 1999.

FANTIN, G. M.; SAWAZAKI, E.; BARROS, B. C. Avaliação de variedades de milho-pipoca quanto à resistência a doenças e qualidade da pipoca. **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna, 17(2): 90-104, 1991.

FAO, Faostat, **Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016, Disponível em: <http://www.fao.org/statistics/databases/en/>, Acesso em: 10 dez. 2017.

FRANÇA, C. G.; DEL GROSSI, M. E.; MARQUES, V. P. M. de A. **O censo agropecuário 2006 e a agricultura familiar no Brasil**. Brasília: MDA, 2009.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**. Viçosa - MG, v.61, n.7, p. 819-828, 2014.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnol. Adv.** 15: 353-378, 1997.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R.; ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 643-650, 2003.

GOODMAN, M. M.; SMITH, J. S. C. Botânica. In: PATERNIANI, E. E VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção de milho**, Campinas, Fundação Cargill, p. 41-78, 1987.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacteria endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 43, p. 895–914, 1997.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**. Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**. 321:235-257, 2009.

HELMAN, Y.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: ROSENBERG, E.; GOPHNA, U. (Eds.) **Beneficial microorganisms in multicellular life forms**. Berlin Heidelberg: Springer, p. 89-103, 2012.

HESS, A. A. **Ecologia e produção agrícola**. São Paulo, Livraria Nobel, 126p, 1980.

HOSENEY, R. C.; ZHANG, W. Factors affecting expansion of corn meals with poor and good expansion properties. **Cereal Chemistry**, Manhattan, v. 75, p. 639-643, 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, 331:413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 38 p, 2011.

IBGE. **Produção Nacional de Milho Pipoca**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/estatisticas_previsa_o_safras/default.shtm> Acesso em: 09 out. 2017.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogenfixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**. 140:679-693, 1989.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant-growth promoting rhizobacteria - evidence that the mode of action involves root microflora interactions. **Phytopathology**. 69:1034-1034, 1979.

KOKUSZKA, R. **Avaliação do teor nutricional de feijão e milho cultivados em sistemas de produção convencional e agroecológico na região Centro-Sul do Paraná**. 113 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for growth plant promotion. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indoles-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**. London, v.8, p. 298-300, 2000.

LAVRINENKO K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 60:2832-2837, 2010.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAZ-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis gene. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 5384-5391, 2004.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum fermentarium* sp. nov. a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter, **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**. 63:3762-3768, 2013.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 59:761-765, 2009.

LIU, J. C.; HUANG, Y. Q.; ZHOU, J. F.; BIAN, F. R.; CHEN, F. J.; MI, G. H. Identification of quantitative trait loci for phytic acid concentration in maize grain under two nitrogen conditions. **Journal of Integrative Agriculture**. 12:765-772, 2013.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 50, p. 301-320, 1997.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S. W.; SA, T. M. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. República da Coréia, v. 59, p. 22-27, 2009a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; SUANDARAM, S.P. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**. Berlim, v. 41, n.5, p. 350-358, 2005.

MAGALHÃES, F. M. M.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid- tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 55: 417-430, 1983.

MAHAFFEE, W. F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUURDE, J. W.; VAN DER WOLF, J. M.; VANDEN BRINK, M.; KLOEPPER, J. W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immune fluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for

monitoring the environmental fate of *rhizobacterium*, **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 63, p. 1617-1622, 1997.

MANGELSDORF, P. C. **Corn its origin, evolution and improvment**. Cambridge: Harvard University, 1974. 262 p.

MANGELSDORF, P. C.; MC NEISH, R. S.; GALINAT, W. C. Domestication of corn. **Science**. 143: 538-545, 1949.

MAPA. **Registro nacional de cultivares**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacionalcultivares>. Acesso em: 15 set. 2016.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57: 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57: 2805-2809, 2007b.

MIRANDA, G. V.; COIMBRA, R. R.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 38(6): 681-688, 2003.

MITTER, B.; AFZAL, M.; BRADER, G.; SESSISTCH, A. Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria. **Advances in Agronomy**. 121: 381-445, 2013.

MONTEIRO, R.; BALSANELLI, E.; TULESKI, L.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R.; BAURA, V. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; WEISS, V. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**. 80:441-451, 2012.

PANDOLFO, C.M.; VOGT, G.A.; BALBINOT JUNIOR, A.A.; GALLOTTI, G.J.M. ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 27, n. 3, p. 94-99, 2015.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento de milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. 817 p, 1999.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. p. 491-552, 2005.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. **Races of maize in Brazil and adjacent áreas**. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Mays y Trigo), México, D.F, 1977.

PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção de milho**, 2. Ed. Campinas: Fundação Cargil, p.413-421, 1987.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E.T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 56:1263–1267, 2006.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of interacting the plant. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa. v. 43, p. 577-582, 1997a.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

RADWAN, T. EI-S, EI-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**. v.32, p.39-54, 2002.

RANGEL, R. M.; AMARAL JUNIOR, A. T.; VIANA, A. P.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; PEREIRA, M. G. Prediction of popcorn hybrid and composite means. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. 7:288-296, 2011.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**. 37:43-51, 1987.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**. 111: 743-767, 2013.

SAWAZAKI, E.; MORAIS, J. F. de LAGO, A. A. Influência do tamanho e umidade do grão na expansão da pipoca South American Mushroom. **Bragantia**. Campinas, v. 45, n. 2, p. 363 - 370, 1986.

SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience**, 5:8-14, 2013.

SILVA, E. D., MURAOKA, T., VILLANUEVA, F. C. A. E ESPINAL, F. S.C. (2009). Aproveitamento de nitrogênio pelo milho, em razão da adubação verde, nitrogenada e fosfatada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44, 118-127.

SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov, sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 49:541-544, 1999.

SOUZA, A.R.; MIRANDA, G.V.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, L.V. Predicting the genetic

gain in the Brazilian with maize landrace. **Ciência Rural**, 39:19-24,2009.

SOUSA, D.M.G. & LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D.M.G. & LOBATO, E., eds. Cerrado: correção do solo e adubação. 2.ed. **Planaltina**, Embrapa Cerrados, 2004. p.129-144.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. **Advances in Botanical Research**, 51:283-320, 2009.

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

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v. 183, p. 214-220, 2001.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

THULER, D. S.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H. R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**. 37: 174-178, 2003.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

USDA - United States Department of Agriculture. **Safrá mundial de milho 2018/19 - 6º Levantamento do USDA - outubro de 2019**. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safrá-mundial-de-milho-2/>>. Acesso em: 28, outubro, 2019

VAN DOMMELEN, A., VANDERLEYDEN, J. Associative nitrogen fixation. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Biology of the nitrogen cycle**. Amsterdam: Elsevier, p.179-192, 2007.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**. 119: 243-254, 2007.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**. Valparaiso, v. 91, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**. 255: 571-586, 2003.

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum, genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, 356: 51-66, 2012.

WELLER, D. M. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. **Phytopathology**, 97: 250-256, 2007.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp., a new nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55: 1435-1438, 2005.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58: 959–963, 2008.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indol-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 259, p. 572-576, 1999.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63: 2618 - 2624, 2013.

ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; LAI, R. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province China. **The Journal of General and Applied Microbiology**. 55:1-7, 2009.

ZIEGLER, K. E., ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**, Iowa: CRC Press, p.189-223, 1994.

ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, J. R. C.; HUNGRIA, M.; Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1875-1881, 2010.

ZINSLEY, J. R.; MACHADO, J. A. Milho-pipoca. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção de milho**. 2ed. Rev. aum, Campinas: Fundação Cargill, p. 411-422, 1987.

CAPÍTULO 2

METHODS OF INOCULATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA IN SPECIALTY MAIZE GENOTYPES UNDER AN ORGANIC AGRICULTURE SYSTEM

* Artigo aceito e publicado no Periódico Acta Scientiarum. Agronomy, v. 44, e54 910, 2022.

ABSTRACT

Organic agriculture systems have the nutrients supplied by plant or animal by-products, bioinoculants, and compost-based products as earthworm composts and green manures. However, the quantitative and qualitative parameters of soil amendments depend on their sources, and soil amendments are generally not sufficient to supply the nutritional requirements of maize crops. Moreover, specialty maize requires high levels of N. Thus, the aim of this study was to investigate specialty maize varieties supplied with two microbial inoculants applied in two inoculation methods. These factorial treatments were compared with their checks (varieties without inoculation), and the interaction among these factors was also investigated. The trials were carried out during the growing season in 2017–2018 in the State University of Maringá. The popcorn trial followed the randomized complete block design where the factorial $3 \times 2 \times 2 + 3$ had five replications. The trial with white grits maize followed the same experimental design but the factorial scheme was $2 \times 2 \times 2 + 2$ with three replications. Both trials had maize varieties and two species of microbial inoculants (*Azospirillum brasilense* and *Methylobacterium* sp.) applied in two inoculation methods, in the seeds and the foliar spray at V4 stage of plant development. The response traits were grain yield and the components of crop production. In both trials, we verified that the majority of the interactions among the factors was non-significant ($p > 0.05$), indicating the independence of these factors. Furthermore, the microbial inoculants had no beneficial effects on the traits. The possibility of a higher crop yield did not confirm the application of the inoculant in the stage V4. The organic compost may be the key point in mitigating the treatments with microbial inoculants due to the availability of N in the first stages of plant development. The traits also suggest the necessity of more trials about the influence of microbial inoculants on specialty maize production.

Keywords: green agriculture, popcorn, white grits maize, bioinoculants.

INTRODUCTION

Brazil has been one of the largest organic food producers, with a hectareage of 1.13 million and a 19 % increase in the number of organic farmers in the last decade (Lima, Galiza, Valadares, & Alves, 2019). This growth has been the result of an increased costumers' preference for healthy food, producing quality and fair trade. In this scenario, maize crops have been important players due to their versatile roles in rural estates producing plant and animal food, applying rotational and plant succession systems, and allowing the consortium of crops (Cruz et al., 2006). Furthermore, specialty maize production such as for white grits corn, sweet corn, baby corn, and popcorn could increase the profits from organic agriculture systems because they aggregate significant values from the produce.

The conventional farming system is considered highly dependent on external inputs such as chemical fertilizers that can, when used improperly, cause contamination of the soil, water, and air. High dependence on fertilizers, for example, could cause increased energy costs for the conversion of atmospheric N (Macdonald, Bennett, Potter, & Ramankutty, 2011).

The excess nutrients applied in conventional agriculture could cause environmental problems. The environmental costs of all N losses in Europe have recently been estimated at 70 to 320 billion euros per year, which outweighs the direct economic benefits of the use of N in agriculture (Foley et al., 2011). Conventional agriculture is considered one of the main polluters of water resources, with salinity and nitrate contamination being the main pollution indicators (Diaz & Rosenberg, 2008). In agriculture, high grain yield demand high N levels, and maize has the highest absorption capacity of nutrients from the soil (Setiyono, Walters, Cassman, Witt, & Dobermann, 2010).

The input of N into organic agriculture systems is through plant or animal by-products, organic composts, green manures, earthworm composts, and biofertilizers (Shennan et al., 2017). However, the quality of these inputs depends on their sources, and their nutritional composition may be insufficient to meet the crop's nutritional needs. Among the alternatives used to complement the supply of nutrients in the organic system is the use of inoculants containing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Larsen et al., 2017). This group of bacteria has an important effect on the uptake of nutrients by plants, as they work as bio-fertilizers and phyto-stimulants and they mitigate the biotic and abiotic stresses (Pii et al., 2015; Zeffa et al., 2019). The genera of PGPR that are associated to crops are the *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Gluconacetobacter*,

Herbaspirillum, *Metylobacterium*, and *Pseudomonas* (Chandra, Pallavi, Barh, & Sharma, 2018).

In maize, the genus *Azospirillum* has been the focus of investigations (Hungria, Campo, Souza, & Pedrosa, 2010; Fukami, Nogueira, Araujo, & Hungria, 2016; Spolaor et al., 2016; Zeffa et al., 2018; Zeffa et al., 2019), as it has been used as an inoculant in Brazil. *Azospirillum* promotes plant growth through the biosynthesis and release of amino acids, indoleacetic acid, cytokinins, and other polyamines that promote root growth (Vejan, Abdullah, Khadiran, Ismail, & Nasrulhaq Boyce, 2016). Furthermore, this genus fixes N from the air, with a direct contribution to the available N in non-leguminous species (de-Bashan et al., 2016). In Brazil, the standard inoculation of maize with *A. brasilense* is carried out by mixing microbial strains with the seeds. However, seed treatment with fungicides may be toxic to these microorganisms and might affect the efficiency of the *Azospirillum* as well as other PGPR (Yang, Hamel, Vujanovic, & Gan, 2011), which is not a part of the organic agriculture scope. Thus, post-emergence inoculation may be the alternative (Fukami et al., 2016; Galindo et al., 2019; Omara et al., 2020). Furthermore, Andrade, Zoz, Zoz, Oliveira, and Witt (2019) applied *A. brasilense* in the seeds and verified lower percentage and index of seedling emergence in some genotypes. Moreover, the application of *A. brasilense* in seeds or into furrows also reduced the percentage of emergence and increased the average time of emergence in some genotypes of sorghum.

Genus *Methylobacterium*, also called pink-pigmented facultative methylotrophic (PPFM) bacteria, has also been widely studied as a plant growth-promoting bacteria in several agricultural crops (Chanratana et al., 2017; Grossi et al., 2020; Krug et al., 2020). Species of this genus benefit plants by the production of indole acetic acid, cytokinins, and vitamin B12 or through the production of growth-modulating enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) desaminase (Joe et al., 2013; Dourado et al., 2015).

In this study, we hypothesized that spraying other strains of bacteria on maize leaves at stage V4, as an additional treatment to the seed application, could increase the grain yield of some genotypes. The foliar spray at V4 stage may also be dependent on the maize genotype and bacterial strains. Thus, we aimed to analyze the interaction of two inoculants with varieties of popcorn and white grits maize applied under two inoculation methods and verify the possibility of increasing the crop yield under the organic system of crop production.

MATERIAL AND METHODS

Experimental conditions

The trials were carried out in the growing season from 2017 to 2018 in the Iguatemi Research Farm, State University of Maringá (UEM), northwestern Paraná State (23°11" SL, 52°03" WL, and altitude of 550 m). The soil is the *Latosolo Vermelho eutroférico*, having a sandy-clay-silt texture based on the Brazilian classification (EMBRAPA, 2018). The physical structure contains sand (75 %), clay (21 %), and silt (4 %). The experimental site was certified as an organic agriculture system of crop production by the ECOCERT. We collected the maximum and minimum daily temperatures and rainfalls along the experimental period, as shown in figure 1.

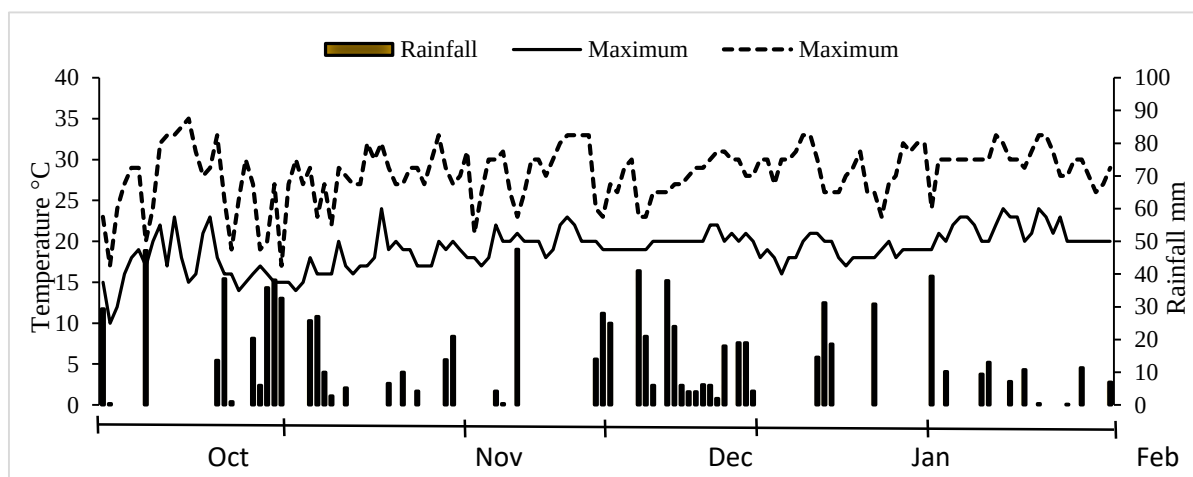


Figure 1. Maximum and minimum daily temperatures and rainfalls along the experimental period; Maringá, 2017-2018

The soil chemical analysis (0–20 cm) is reported in Table 1.

Table 1. Results from the soil chemical analysis

pH		cmol _c dm ⁻³							%				
CaCl ₂	H ₂ O	Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	V	Ca	Mg	K	
5.2	5.9	0.09	3.60	1.42	0.87	0.19	2.48	7.45	57.33	23.36	14.31	2.82	
				g dm ⁻³		mg dm ⁻³							
Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	$\frac{(Ca+Mg)}{K}$	OM	C	P	S	Cu	Zn	Fe	Mn	Na	B
1.63	7.47	4.58	19.25	16.29	5.31	8.71	6.81	264.	1.62	42	71	NA	0.19

SB = total of bases; OM = organic matter; T = CEC total; V = base saturation; and NA = not available

The open pollination varieties used in this study were “IAC 125” (Instituto Agronômico de Campinas, IAC), “Composto Angela” (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa), and “Composto Gaúcha” (State University of Maringá (UEM). In the original genetic background, the genotype “IAC 125” is one top-cross of popcorn, and “IAC Nelore” and “IPR 119” (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná– IDR-Paraná) are hybrids from the inbred lines of white grits maize. The “Composto Gaúcho” is the result of crossing American hybrids with national varieties. Furthermore, many generations were obtained at random crosses by the plants of each hybrid; therefore, all of them may be considered open pollination varieties.

Two seeds were sowed into planting holes, but 40 d later, we thinned them to maintain just one plant in every planting hole. The plots had eight lines of 6 m in length, 0.9 m apart, and the useful area was of 9 m². Organic compost from laying hen manure following the composition in Table 2 was applied into the soil at a dose of 4.5 t ha⁻¹.

Table 2. Chemical analysis of the laying hen manure

Nutrients and humidity determination	Unity	Sample
Nitrogen (N)	g kg ⁻¹	19.53
Calcium (Ca ²⁺)	g kg ⁻¹	26.25
Magnesium (Mg ²⁺)	g kg ⁻¹	7.63
Phosphorus (P)	g kg ⁻¹	10.57
Potassium (K ⁺)	g kg ⁻¹	32.00
Humidity	%	12.86

We controlled the insects (*Spodoptera frugiperda*) by applying *Azadiractina*, 300 mL ha⁻¹), following the recommendation from the company, and we controlled the weeds in the plots by handy-hoeing.

Bacterial growth and inoculation

The inoculants from the bacterial collection of the Laboratory of Molecular Biochemistry in the State University of Londrina (LBM-UEL) were applied at a dose of 1×10^8 cells. We cultivated the colonies of *A. brasilense* strain Ab-V5 and *Metylobacterium* sp. strain 40 GRM1 in liquid medium Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986), 2.0 g of glucose, 1.5 g of peptone, 2.0 g of yeast extract, 0.5 g of K₂HPO₄, 0.5 g of MgSO₄, and 1 L of distilled water at

pH 6.0 for 24 h. Thereafter, we multiplied them in 250 mL of liquid medium M15 (Oliveira et al., 2017). This composition was formulated by the LBM-UEL, a patent presented to the National Institute of Industrial Property (INPI, deposit in the BR 1020140171746), and we cultivated them under shaking using an orbital incubator for 48 h (180 rpm at 28 °C). Next, we determined the cell concentration in the Neubauer chamber and normalized the cell suspension culture with dilution in the inoculant UEL liquid. We applied two inoculation methods—in the seeds (30 mL kg⁻¹) and in the stage V4 by spraying it on the growing plants (1.0 L ha⁻¹).

Traits

The harvesting of the plants in the stage R6 from the two central lines of the useful area was a handy work. We also evaluated the plant height (m), ear height (m), ear number per plot (n), ear length (cm), stalk and ear diameter (cm), yield (kg ha⁻¹), and biomass of 100 grains (g).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design in both trials was randomized complete blocks with the treatments following the triple factorial with additional checks (varieties without the application of microorganisms). The popcorn trial followed the factorial $3 \times 2 \times 2 + 3$ (varieties $\times$ inoculants $\times$ inoculation methods + checks) with five replications. The white grits maize had the trial following the factorial $2 \times 2 \times 2 + 2$ (varieties $\times$ inoculants $\times$ inoculation methods + checks) with three replications.

After verifying the homogeneity of variance and the normality of residues using the tests de Bartlett and Shapiro-Wilk, respectively, we analyzed the data by analysis of variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$). We applied t-test (Fisher's least significant difference) to discriminate the varieties of popcorn, but we compared the white grits maize varieties by the F test. The Dunnett test compared the checks with the treatments in the factorial. The software SISVAR (Ferreira, 2011) and SAS 9.4 (2013) did the respective analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The main factor varieties in the trial with popcorn had significant effects ($p < 0.05$) for all the traits, indicating genetic differences (Table 3). Otherwise, the responses from both inoculants (*A. brasilense* and *Methylobacterium* sp.) were non-significant ($p > 0.05$) (Table 3) as well as from all the interactions among the factors. These results for the interactions indicated the independence of factors. We also found significant differences for the inoculation methods, seeds or V4, ear height, ear number per plot, stalk diameter, and biomass of 100 grains (Table 3). The coefficients of variation ranged from 6.03% for the ear diameter (ED) to 17.92 % for the grain yield (Y), which are low to average values, indicating accuracy in the environmental control by the experimental design and the outcome of the reliable data (Fritsche-Neto, Vieira, Scapim, Miranda, & Rezende, 2012).

Table 3. Analysis of variance of eleven traits in the popcorn crops: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN); stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grain (B100) from the trial in Iguateme Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018

Sources of variation	DF	Mean Square ⁽¹⁾							
		PH (m)	EH (m)	EN (-)	SD (cm)	ED (cm)	EL (cm)	Y ⁽²⁾ (kg ha ⁻¹)	B100 (g)
Variety (V)	2	0.492*	0.523*	482.017*	26.365*	217.113*	11.137*	7.062*	126.842*
Methods (M)	1	0.043 ^{ns}	0.044*	160.067*	19.574*	0.0008 ^{ns}	0.308 ^{ns}	0.004 ^{ns}	8.050*
Inoculant (I)	1	0.022 ^{ns}	0.006 ^{ns}	8.067 ^{ns}	11.731 ^{ns}	0.015 ^{ns}	0.628 ^{ns}	0.010 ^{ns}	0.712 ^{ns}
V × S	2	0.003 ^{ns}	0.004 ^{ns}	59.617 ^{ns}	1.128 ^{ns}	0.811 ^{ns}	0.559 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.177 ^{ns}
V × I	2	0.006 ^{ns}	0.001 ^{ns}	25.017 ^{ns}	0.833 ^{ns}	3.209 ^{ns}	0.476 ^{ns}	0.111 ^{ns}	0.099 ^{ns}
S × I	1	0.002 ^{ns}	0.006 ^{ns}	32.267 ^{ns}	1.270 ^{ns}	0.687 ^{ns}	0.032 ^{ns}	0.013 ^{ns}	3.208 ^{ns}
V × S × I	2	0.000 ^{ns}	0.004 ^{ns}	57.817 ^{ns}	0.082 ^{ns}	3.566 ^{ns}	0.680 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.022 ^{ns}
Factorial vs Checks	1	0.008 ^{ns}	0.00 ^{ns}	38.881 ^{ns}	16.442*	0.707 ^{ns}	0.559 ^{ns}	0.384*	1.617 ^{ns}
Checks	2	0.068*	0.075*	114.867*	9.213 ^{ns}	34.29*	1.196 ^{ns}	1.220*	22.947*
(Treatments)	(14)	0.087*	0.091*	122.711*	8.876*	37.099*	2.116 ^{ns}	1.230*	22.411*
Blocks	4	0.142	0.043	106.353	5.410	9.243	2.339	0.413	3.812
Residual	56	0.011	0.008	35.075	3.580	4.052	1.386	0.086	0.883
Total	74	-	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)		6.55	10.55	15.47	11.20	6.03	8.61	17.92	6.37
Overall average		1.630	0.851	38.293	16.898	33.355	116.574	1.639	14.737
Check average		1.608	0.831	39.733	15.962	33.549	13.846	1.496	14.443

Basic assumptions ⁽³⁾								
Shapiro-Wilk – W	0.9886 ^{ns}	0.9856 ^{ns}	0.9839 ^{ns}	0.9840 ^{ns}	0.9270*	0.9799 ^{ns}	0.5117*	0.9884 ^{ns}
Bartlett – χ^2	12.1134] ⁿ s	27.1458*	13.5732 ^{ns}	13.3626 ^{ns}	41.8949*	12.5792 ^{ns}	645.3000 *	9.3245 ^{ns}

DF = Degree of freedom

CV = Coefficients of variation;

(1)*:significant effect at 5 % by the F test; ns, non-significant effect at 5 % by the F test;

(2):productivity correction according to the grain humidity;

(3):Basic assumptions were normal residues by Shapiro-Wilk test, calculated value of W; homogeneity of variance by Bartlett; and χ^2 , chi-square value.

In Table 3, the contrast “Factorial vs Check” was significant ($p < 0.05$) for stalk diameter (SD) and Y, indicating differences in the means of the factorial treatment scheme and the means of the additional checks (varieties without inoculation). Thus, the Dunnett test (Table 4) compared the means from the factorial with every mean from the additional checks (varieties without inoculants). In fact, we found no difference between varieties under inoculation and the respective checks for both responses. According to Matsumura et al. (2015), the response to inoculation depends on plant genotypes, bacterial strains, environmental conditions, agricultural practices, and quantity and quality of the bacterial cells inoculated. In this sense, it is interesting to point out that when these bacteria were inoculated in soils with a large amount of nutrients, they generated energy costs for the plants, thus not improving the production components in the first harvest that was used (Oliveira et al., 2020).

Table 4. Estimates of contrasts from stalk diameter (SD) and grain yield (Y)

		Checks		
		P ₂ SI	P ₃ SI	P ₁ SI
SD	P ₂ AS	1.112	0.732	3.250
	P ₂ MS	1.910	1.530	4.048* ⁺
	P ₂ AV ₄	0.666	0.286	2.804
	P ₂ MV ₄	1.098	0.718	3.236
	P ₃ AS	1.274	0.894	3.412
	P ₃ MS	2.886	2.506	5.024* ⁺
	P ₃ AV ₄	0.034	0.414	2.104
	P ₃ MV ₄	1.062	0.682	3.200
	P ₁ AS	0.682	1.062	1.456
	P ₁ MS	0.434	0.054	2.572
	P ₁ AV ₄	1.482	1.862	0.656

	P ₁ MV ₄	1.230	1.610	0.908
Y	P ₂ AS	0.2612	0.1254	0.8552 ^{*+}
	P ₂ MS	0.1162	0.2704	0.7102 ^{*+}
	P ₂ AV ₄	0.2888	0.0978	0.8828 ^{*+}
	P ₂ MV ₄	0.1570	0.2296	0.7510 ^{*+}
	P ₃ AS	0.6104 ^{*+}	0.2238	1.2044 ^{*+}
	P ₃ MS	0.7144 ^{*+}	0.3278	1.3084 ^{*+}
	P ₃ AV ₄	0.5470 ^{*+}	0.1604	1.1410 ^{*+}
	P ₃ MV ₄	0.7304 ^{*+}	0.3438	1.3244 ^{*+}
	P ₁ AS	0.4834	0.8700 ^{*-}	0.1106
	P ₁ MS	0.6064 ^{*-}	0.9930 ^{*-}	0.0124
	P ₁ AV ₄	0.4878	0.8744 ^{*-}	0.1062
	P ₁ MV ₄	0.5276	0.9142 ^{*-}	0.0664

Values followed by ^{*+} are different and higher than that of the check, Dunnett test at 5 % of probability;
 Values followed by ^{*-} are different and similar to that of the check, Dunnett test at 5 % of probability;
 P₁, IAC 125; P₂, “Composto Angela”; P₃, “Composto Gaúcha”; A, *Azospirillum*; M, *Methylobacterium*;
 S, seed application; V₄, application at the plant stage V₄; and SI, checks.

In the current trial, the effect of the organic fertilizer may be the key factor that affected the absence of response from the biofertilizer because of the high availability of N in the initial stages of development. Rozier, Hamzaoui, Lemoine, Czarnes, and Legendre (2017), who studied the effect of the inoculation with *Azospirillum lipoferum* associated with different levels of N fertilizer, verified that the application of the chemical fertilizer increased the grain yield. However, there was no influence of the inoculation with *A. lipoferum* on the increase. This result suggests that both technologies are non-additive. Similarly, a meta-analysis study about the effect of the *Azospirillum* sp. on the crop yield of maize by Zeffa et al. (2018) also found a non-additive effect of the inoculant with the application of N fertilizer, and the increase was observed just in the absence of the side-dressing chemical fertilizer.

The popcorn varieties “Composto Angela” and “Composto Gaúcha,” which had the seeds inoculated with *Methylobacterium* sp. (P₂MS and P₃MS, respectively), had better performance than that of the check “IAC 125” (P₁SI) for the trait SD (Table 4). As for the grain yield, the variety “Composto Angela,” which had the seeds and V₄ stages inoculated with *Methylobacterium* sp. or *Azospirillum* sp. (P₂AS, P₂MS, P₂AV₄, and P₂MV₄), differed and had a higher grain yield than that of the check “IAC 125” (P₁SI). Otherwise, “Composto Gaúcha” was different and higher than the checks “Composto Angela” and “IAC 125” (P₂SI and P₁SI,

respectively) when inoculated with microorganisms both in the seeds and stages of development (P₃AS, P₃MS, P₃AV₄, P₃MV₄). These results corroborated those of the other trials in literature about the genotypes and their interactions with the inoculants (Matsumura et al. 2015; Vidotti et al., 2019; Zeffa et al., 2019). A study by Zeffa et al. (2019), which assessed the effect of *A. brasilense* on 27 maize genotypes from three trials, also reported different responses from the genotypes after the inoculation.

In Table 5, we report the results from the t test (LSD) for the different varieties of popcorn. We observed that “Composto Angela” and “Composto Gaúcha” had similar responses for the majority of the traits. The variety “IAC 125” had the lowest estimate for plant height (PH) with 1.46 m, ear height (EH) with 0.68 m, and ED with 29.60 cm, but the “Composto Gaúcha” had higher values than those of the other varieties for Y (2.22 kg plot⁻¹) and biomass of 100 grains (B100) with 17.64 g. All these results could be explained by inbreeding or losses in the hybrid vigor from several traits of the “IAC 125.”

Table 5. Means from the t-test (LSD) discriminating eight traits of popcorn: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018

Varieties	PH (m)	EH (m)	EN (-)	SD (cm)	ED (cm)	EL (cm)	Y ⁽¹⁾ (kg ha ⁻¹)	B100 (g)
“Composto Angela”	1.771 a	0.993 a	39.250 ab	17.745 a	34.416 a	13.987 a	1.771 b	13.956 b
“Composto Gaúcha”	1.673 a	0.899 a	42.050 a	17.845 a	35.904 a	14.133 a	2.216 a	17.644 a
IAC 125	1.464 b	0.678 b	32.500 b	15.808 a	29.601 b	12.774 a	1.039 c	12.830 c

⁽¹⁾ Means followed by the same letter in the column do not differ from one another at 5 % of probability by the t-test (LSD). Crop yield was corrected by the humidity.

Based on the inoculation methods, popcorn plants had significant differences ($p < 0.05$) for EH, EN, SD, and B100 (Table 6). The application of inoculants on the seed promoted higher values for EH, SD, and B100 than that of EN, from which the highest value was caused by the inoculant spray in the stage V4, which was investigated and reported for the first time (Table 6). The possibility of a higher crop yield did not confirm the application of the inoculant in the stage V4, as the number of ears per plot is just a component of the grain yield.

Table 6. Means from the inoculation methods of the following traits of popcorn: ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018

Inoculation methods (¹)	EH (m)	EN	SD (cm)	B100 (g)
Seed	0.884 a	36.300 b	17.704 a	15.176 a
V4	0.829 b	39.567 a	16.561 b	14.444 b

(¹) Means followed by the same letter in the column do not differ from one another at 5 % of probability by the F test.

In the white grits maize, we did not find significant differences ($p > 0.05$) for all the interactions among the factors for all traits, except for the interaction of varieties (V) $\times$ inoculation methods (M) for ear length (EL) and B100 (Table 7). We did not carry out the partition of this interaction, V $\times$ M, for the two traits, as both are components of the grain yield, and these principal traits had no significant difference. The contrast “Factorial vs Check” did not have significant differences for all the traits. All these inferences are valuable because the CVs from all the traits were low or average, indicating high experimental accuracy. The varieties of white grits maize had significant differences ($p < 0.05$) in the traits PH, EH, ED, and B100 (Table 7), and the “IAC Nelore” had means higher than that of the “IPR119” (Table 8). Similarly, we did not find efficiency of the inoculation applied in the V4 stage in comparison to the application to the seeds (Table 8).

Table 7. Analysis of variance for ten traits of white grits maize: plant height (PH), ear height (EH), ear number per plot (EN), stalk diameter (SD), ear diameter (ED), ear length (EL), grain yield (Y), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018

Sources of variation	DF	Mean Square(²)							
		PH (m)	EH (m)	EN	SD (cm)	ED (cm)	EL (cm)	Y(²) (kg ha ⁻¹)	B100 (g)
Varieties (V)	1	0.308*	0.123*	80.667 ^{ns}	1.675 ^{ns}	32.155*	0.015 ^{ns}	0.496 ^{ns}	71.553*
Methods (M)	1	0.009 ^{ns}	0.024 ^{ns}	0.167 ^{ns}	4.386 ^{ns}	12.995 ^{ns}	2.344 ^{ns}	0.021 ^{ns}	5.415 ^{ns}
Inoculant (I)	1	0.107 ^{ns}	0.089*	2.667 ^{ns}	0.150 ^{ns}	14.789 ^{ns}	0.448 ^{ns}	0.378 ^{ns}	16.138 ^{ns}
V $\times$ S	1	0.056 ^{ns}	0.034 ^{ns}	54.000 ^{ns}	3.713 ^{ns}	10.720 ^{ns}	11.152*	0.010 ^{ns}	45.706*
V $\times$ I	1	0.009 ^{ns}	0.007 ^{ns}	1.500 ^{ns}	0.564 ^{ns}	3.360 ^{ns}	0.400 ^{ns}	0.006 ^{ns}	1.540 ^{ns}
S $\times$ I	1	0.042 ^{ns}	0.015 ^{ns}	42.667 ^{ns}	3.168 ^{ns}	2.220 ^{ns}	1.075 ^{ns}	1.238 ^{ns}	2.136 ^{ns}
V $\times$ S $\times$ I	1	0.007 ^{ns}	0.010 ^{ns}	1.500 ^{ns}	2.124 ^{ns}	1.179 ^{ns}	0.400 ^{ns}	0.125 ^{ns}	0.960 ^{ns}
Factorial vs Checks	1	0.008 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.832 ^{ns}	6.130 ^{ns}	1.358 ^{ns}	1.912 ^{ns}	0.014 ^{ns}	0.304 ^{ns}
Checks	1	0.066 ^{ns}	0.045 ^{ns}	54.000 ^{ns}	2.761 ^{ns}	5.587 ^{ns}	0.595 ^{ns}	1.084 ^{ns}	26.250 ^{ns}
(Treatments)	(9)	0.068*	0.039*	26.444 ^{ns}	2.741 ^{ns}	9.374 ^{ns}	2.038 ^{ns}	0.375 ^{ns}	18.889*
Blocks	2	0.270	0.089	77.500	5.072	16.239	3.479	1.754	13.543

Residual	18	0.027	0.015	35.278	6.191	5.103	1.471	0.455	7.457
Total	29	-	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)		8.53	12.76	12.64	12.41	4.77	7.08	17.59	8.64
Overall average		1.936	0.968	47.000	20.056	47.326	17.130	3.834	31.593
Check Average		1.902	0.957	47.333	19.152	47.752	17.635	3.878	31.392
Basic assumptions ⁽³⁾									
Shapiro-Wilk – W		0.974 ^{ns}	0.984 ^{ns}	0.965 ^{ns}	0.962 ^{ns}	0.963 ^{ns}	0.969 ^{ns}	0.965 ^{ns}	0.952 ^{ns}
Bartlett – χ^2		3.650 ^{ns}	7.106 ^{ns}	5.284 ^{ns}	5.863 ^{ns}	13.950 ^{ns}	11.271 ^{ns}	5.825 ^{ns}	7.819 ^{ns}

DF = Degree of freedom

CV = Coefficients of variation;

^{(1)*}: significant effects at 5 % by the F test; ns, non-significant effect at 5 % by the F test;

⁽²⁾: crop yield corrected to grain humidity;

⁽³⁾: Basic assumptions were normal residues by the Shapiro-Wilk, value of the calculated W; homogeneity of variance by Bartlett; χ^2 , chi-square value.

Table 8. Means of varieties for the following traits in crops of white grits maize: plant height (PH), ear height (EH), ear diameter (ED), and biomass of 100 grains (B100) from the trial in Iguatemi, Maringá, Paraná State, 2017–2018

Varieties ⁽¹⁾	PH (m)	EH (m)	ED (cm)	B100 (g)
‘IPR 119’	1,830 b	0,899 b	46,063 b	29,917 b
‘IAC Nelore’	2,058 a	1,043 a	48,378 a	33,700 a

⁽¹⁾ Means followed by the same letter in the column do not differ from one another at 5 % of probability by the F test.

Mumbach et al. (2017) studied the effect of seed inoculation of commercial maize with *A. brasilense* and did not find significant responses for the stalk diameter, ear and plant height, and foliar index. Some researchers have reported that seed inoculation is an important alternative for sustainable agriculture systems (Fukami et al., 2016). However, several factors such as weather conditions, soil classification, soil microbiology, cultivars, and fertilizers can affect the responses from the inoculation due to their influence on the bacterial survivorship. All these factors must be a motive of concern as well as the inoculation due to their influence on bacterial survivorship (James, 2000). Portugal et al. (2016) investigated simple hybrids under various doses of N (0, 30, 60, and 90 kg ha⁻¹) together with foliar spraying of *A. brasilense* in the summer growing season and found increases of 14.75 % in the grain yield in seed inoculation.

CONCLUSION

The effects of applying inoculants on the varieties of white grits maize and popcorn were non-significant for the traits under evaluation.

Moreover, possibility of higher crop yield did not confirm the application of the inoculant in the stage V4.

All the literature found for this study had the trials carried out in the conventional agriculture systems. Thus, we suggest more trials under the organic agriculture systems applying new doses of inoculants, with partition of N doses using other organic sources as well as without N application, and with application of organic manures in lines in the soil to better investigate the interaction of the different varieties under organic agriculture systems.

REFERENCES

- Andrade, A.F., Zoz, T., Zoz, A., Oliveira, C.E.S., & Witt, T.W. (2019). *Azospirillum brasilense* inoculation methods in corn and sorghum. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49, e53027. DOI: 10.1590/1983-40632019v4953027
- Chandra, D., Pallavi, Barh, A., & Sharma, I. P. (2018). Plant Growth Promoting Bacteria: A Gateway to Sustainable Agriculture. In Pankaj, & Sharma, A. (Ed.), *Microbial Biotechnology in Environmental Monitoring and Cleanup* (p. 318-338). IGI Global. DOI: 10.4018/978-1-5225-3126-5.ch020
- Chanratana, M., Han, G. H., Choudhury, A. R., Sundaram, S., Halim, M. A., Krishnamoorthy, R., Kang, Y., Sa, T. (2017) Assessment of *Methyloacterium oryzae* CBM20 aggregates for salt tolerance and plant growth promoting characteristics for bio-inoculant development. *AMB Express* 7: 208. DOI: 10.1186/s13568-017-0518-7
- Cruz, J. C.; Konzen, E. A.; Filho, I. A. P.; Marriel, I. E.; Cruz, I.; Duarte, J. O.; Oliveira, M. F.; Alvarenga, R. C. Produção de milho orgânico na agricultura familiar. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. ISSN 1679-1150
- De-Bashan, L. E., Mayali, X., Bebout, B. M., Weber, P. K., Detweiler, A. M., Hernandez, J. P. Bashan, Y. (2016). Establishment of stable synthetic mutualism without co-evolution between microalgae and bacteria demonstrated by mutual transfer of metabolites (NanoSIMS isotopic imaging) and persistent physical association (Fluorescent *in situ* hybridization). *Algal Research*, 15, 179-186. DOI: 10.1016/j.algal.2016.02.019
- Diaz, R.J.; Rosenberg, R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, Nova York, v.321, p.926-929, 2008. DOI: 10.1126/science.1156401
- Dourado, M. N., Neves, A. A. C., Santos, D. S., Araújo, W. L. (2015) Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International* 2015: Article ID 909016. DOI: 10.1155/2015/909016
- Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001
- Foley, J.A.; Ramankutty, N.; Brauman, K.A.; Cassidy, E.S.; Gerber, J.S.; Johnston, M.; Mueller, N.D.; O'Connell, C.; Ray, D.K.; West, P.C.; Balzer, C.; Bennett, E.M.; Carpenter,

S.R.; Hill, J.; Monfreda, C.; Polasky, S.; Rockstrom, J.; Sheehan, J.; Siebert, S.; Tilman, D.; Zaks, D.P.M. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, Londres, v.478, p.337-342, 2011. DOI: 10.1038/nature10452

Fritsche-Neto, R., Vieira, R. A., Scapim, C. A., Miranda, G. V., & Rezende, L. M. (2012). Updating the ranking of the coefficients of variation from maize experiments. *Acta Scientiarum Agronomy*, 34, 99-101. DOI: 10.4025/actasciagron.v34i1.13115

Fukami, J., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, 6, 1-13. DOI: 10.1186/s13568-015-0171-y

Galindo FS, Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Pagliari PH, Santini JMK, Alves CJ, Megda MM, Nogueira TAR, Andreotti M, Arf O. (2019) Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. *Agronomy Journal*. 111:1985-1997. DOI: 10.2134/agronj2018.07.0481

Grossi, C. E. M., Fantino, E., Serral, F., Zawoznik, M. S., Do Porto, D. A. F., Ulloa, R. M. *Methylobacterium* sp. 2A is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions. *Frontiers in Plant Science* 11: Article 71. DOI:10.3389/fpls.2020.0007

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0

James, E. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. (2000). *Field Crops Research*, 65, 197-209. DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00087-8

Joe, M. M., Saravanan, V. S., Islam, M. R., As, T. (2013) Development of alginate-based aggregate inoculants of *Methylobacterium* sp. and *Azospirillum brasilense* tested under in vitro conditions to promote plant growth. *Journal of Applied Microbiology* 116: 408-423. DOI:10.1111/jam.12384

Krug, L., Morauf, C., Donat, C., Muller, H., Cernava, T., Berg, G. (2020) Plant growth-promoting *Methylobacteria* selectively increase the biomass of biotechnologically relevant microalgae. *Frontiers in Microbiology* 11: article 427. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00427

Larsen, J., Pineda-Sánchez, H., Delgado-Arellano, I., Castellano-Morales, V., Carreto-Montoya, L., & Villegas-Moreno, J. (2017). Interactions between microbial plant growth promoters and their effects on maize growth performance in different mineral and organic fertilization scenarios. *Rhizosphere*, 3, 75–81. DOI: 10.1016/j.rhisph.2017.01.003

Lima, S. K., Galiza, M., Valadares, A., & Alves, F. (2020). Produção e consumo de produtos orgânicos no mundo e no Brasil. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. - Brasília: Rio de Janeiro: Ipea, 1990- ISSN 1415-4765.

Macdonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A.; Ramankutty, N. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Nova York, v.108, p.3086-3091 2011.DOI: 10.1073/pnas.1010808108

Matsumura, E. E., Secco, V. A., Moreira, R. S., Santos, O. J. P., Hungria, M., & Oliveira, A. L. M. (2015). Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Annals of Microbiology*, 65, 2187-2220. DOI: 10.1007/s13213-015-1059-4

Mumbach, G. L., Kotowski, I. E., Schneider, F. J. A., Mallmann, M. S., Bonfada, E. B., Portela, V. O., ...Kaiser, D. R. (2017). Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. *Scientia Agraria*, 18: 97–103.

Oliveira A.L.M, Santos O.J.A.P, Marcelino P.R.F, Milani K.M.L, Zuluaga M.Y.A, Zucareli C, et al. Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.DOI: 10.3389/fmicb.2017.01873

Oliveira, C.E.D.S., Zoz, T., Vendruscolo, E.P. et al. Does *Azospirillum brasilense* and biostimulant improve the initial growth of rice sow at greater depths?. *J. Crop Sci.Biotechnol.* (2020). DOI:10.1007/s12892-020-00055-4.

Omara P, Aula L, Dhillon JS, Oyebiyi F, Eickhoff EM, Nambi E, Fornah A, Carpenter J, Raun W (2020) Variability in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) grain yield response to nitrogen fertilization in long-term experiments. *Comm Soil Sci Plant Anal* 51:403-412. DOI: 10.1080/00103624.2019.1709489

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 403-415. DOI: 10.1007/s13213-015-1059-4

Portugal, J. E. R., Arf, O., Peres, A. R., Castilho, D., Rodrigues, R. A. F., & Garcia, N. F. S. (2016). *Azospirillum brasilense* promotes increment in corn production. *African Journal of Agricultural Research*, 11, 1688-1698. DOI: 10.5897/AJAR2015.10723

Rodrigues Neto, J.; Malavolta Jr, V. A.; Victor, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatho*, v.12, p.16, 1986. Rozier, C., Hamzaoui, J., Lemoine, D., Czarnes, S., & Legendre, L. (2017). Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Scientific Reports*, 7, 7416. DOI: 10.1038/s41598-017-07929-8

SAS Institute. (2013). SAS user's guide: statistics, version 9.3 [Software]. Cary, NC: SAS Institute.

Santos, H.G., Jacomine, P.K., Anjos, L.H.C., Oliveira, V.A., Lumberras, J.F., Coelho, M.R., Almeida, J.A., Araujo Filho, J.C., Oliveira, J.B. & Cunha, T.J.F (2018). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5ª edição. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 356p. ISBN 978-85-7035-800-4

Setiyono, T. D., Walters, D. T., Cassman, K. G., Witt, C., & Dobermann, A. (2010). Estimating maize nutrient uptake requirements. *Field Crops Research*, 118, 158-168. DOI: 10.1016/j.fcr.2010.05.006

Shennan, C., Krupnik, T. J., Baird, G., Cohen, H., Forbush, K., Lovell, R. J., & Olimpi, E. M. (2017). Organic and Conventional Agriculture: A Useful Framing? *Annual Review of Environment and Resources*, 42, 317–346. DOI: 10.1146/annurev-environ-110615-085750

Spolaor, L. T., Gonçalves, L. S. A., Santos, O. J. A. P., Oliveira, A. L. M., Scapim, C. A., Bertagna, F. A. B., & Kuki, M. C. (2016). Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. *Bragantia*, 75, 33-40. DOI: 10.1590/1678-4499.330

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, 21: 573.

DOI: 10.3390/molecules21050573

Videira, S. S., de Oliveira, D. M., de Moraes, R. F., Borges, W. L., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (2012). Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. *Plant and Soil*, 356: 51–66. DOI: 10.1007/s11104-011-1082-6

Vidotti, M. S., Matias, F. I., Alves, F. C., Pérez-Rodríguez, P., Beltran, G. A., Burgueño, J., Fritsche-Neto, R. (2019). Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction. *PLoS ONE*, 14: e0217571. DOI: 10.1371/journal.pone.0217571

Zeffa, D. M., Perini, L. J., Silva, M. B., de Sousa, N. V., Scapim, C. A., Oliveira, A. L. M. de, Gonçalves, L. S. A. (2019). *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS ONE*, 14: e0215332. DOI: 10.1371/journal.pone.0215332

Zeffa, D. M., Fantin, L. H., Santos, O. J. A. P., Oliveira, A. L. M. de., Canteri, M. G., Scapim, C. A., Gonçalves, L. S. A. (2018). The influence of topdressing nitrogen on *Azospirillum* spp. inoculation in maize crops through meta-analysis. *Bragantia*, 77, 493-500. DOI: 10.1590/1678-4499.2017273

Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & Gan, Y. (2011). Fungicide: modes of action and possible impact on non-target microorganisms – Review Article. *ISRN Ecology* (Article ID 130289). DOI: 10.5402/2011/130289

Submissão para publicação na revista *Acta Scientiarum Agronomy*:

Diretrizes para Autores

POLÍTICA DE ACESSO ABERTO

Acta Scientiarum Agronomy é publicada sob o modelo Acesso Aberto e permite a qualquer um a leitura e download, bem como a cópia e disseminação de seu conteúdo de acordo com as políticas de copyright Creative Commons Attribution 3.0.

APCs (TAXA DE PROCESSAMENTO DE ARTIGO) E TAXA DE SUBMISSÃO

Acta Scientiarum Agronomy não cobra aos autores qualquer tipo de taxa de submissão ou publicação.

POLÍTICA CONTRA PLÁGIO E MÁ-CONDUTAS EM PESQUISA

Continuando nossa tradição de excelência, informamos as melhorias editoriais que visam fortalecer a integridade dos artigos publicados por esta revista. Em conformidade com as diretrizes do COPE (*Committee on Publication Ethics*), que visam incentivar a identificação de plágio, más práticas, fraudes, possíveis violações de ética e abertura de processos, indicamos:

1. Os autores devem visitar o website do COPE <http://publicationethics.org>, que contém informações para autores e editores sobre a ética em pesquisa;

2. Antes da submissão, os autores devem seguir os seguintes critérios:

- Com o objetivo de evitar a endogenia e diversidade dos autores publicados, exigimos que, após a publicação na revista, os autores aguardem, no mínimo, 1 ano até publicarem qualquer outro artigo no periódico.
- artigos que contenham aquisição de dados ou análise e interpretação de dados de outras publicações devem referenciá-las de maneira explícita;
- na redação de artigos que contenham uma revisão crítica do conteúdo intelectual de outros autores, estes deverão ser devidamente citados;
- todos os autores devem atender os critérios de autoria inédita do artigo e nenhum dos pesquisadores envolvidos na pesquisa poderá ser omitido da lista de autores;
- a aprovação final do artigo será feita pelos editores e conselho editorial.

3. Para responder aos critérios, serão realizados os seguintes procedimentos:

- a) Os editores avaliarão os manuscritos com o sistema **CrossCheck** logo após a submissão. Primeiramente será avaliado o conteúdo textual dos artigos científicos, procurando identificar plágio, submissões duplicadas, manuscritos já publicados e possíveis fraudes em pesquisa;
- b) Com os resultados, cabe aos editores e conselho editorial decidir se o manuscrito será enviado para revisão por pares que também realizarão avaliações;
- c) Após o aceite e antes da publicação, os artigos poderão ser avaliados novamente.

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:

1. *Acta Scientiarum Agronomy*, ISSN 1807-8621 (Impresso) E ISSN 1807-8621 (*on-line*), é uma publicação contínua da Universidade Estadual de Maringá.

2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Agronomia, incluindo ciência do solo, entomologia agrícola, fertilidade do solo e adubação, física do solo, fisiologia de plantas cultivadas, fitopatologia, fitossanidade, fitotecnia, gênese, morfologia e classificação dos solos, manejo e conservação do solo, manejo integrado de pragas das plantas, melhoramento vegetal, microbiologia agrícola, parasitologia agrícola e produção e beneficiamento de sementes.

3. Os autores se obrigam a declarar que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-

se disponível no endereço:
<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/about/submissions>.

4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do Conselho Editorial da revista.

5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.

6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês.

7. Os artigos serão avaliados por, no mínimo, três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.

8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o **Portal ACTA**, no endereço <http://www.periodicos.uem.br/ojs/>

9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

10. O texto em inglês dos artigos aceitos para publicação será submetido à correção pelas seguintes empresas, segue abaixo, e custeado pelos autores:

- Academic-Editing-Services.com (<http://www.academic-editing-services.com/>)
- American Journal Express (<http://www.journalexperts.com/>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>)
- Elsevier (<http://webshop.elsevier.com/languageservices/>)
- Queen's English (<http://www.queensenglishediting.com/>)
- STTA - Serviços Técnicos de Tradução e Análises (<http://stta.com.br/servicos.php>)

11. Não serão aceitos manuscritos nos quais:

a) os experimentos de campo não incluam dados de dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;

b) a análise de dados obtidos de ambientes controlados seja limitada a apenas um experimento ou bioensaio, sem repetições durante o período;

c) os experimentos se refiram a apenas testes sobre a atividade de produtos químicos ou biológicos contra agentes bióticos ou estresses fisiológicos;

d) os experimentos com cultura *in vitro* sejam limitados ao melhoramento dos protocolos padronizados de cultura ou os que não forneçam novas informações no campo;

e) seus objetivos sejam limitados a registrar a primeira ocorrência de um organismo nocivo ao sistema ecoagrícola ou um estudo básico sobre os parâmetros biológicos do organismo sem uma definida indicação de como esse conhecimento poderia melhorar o manejo da praga no contexto local ou regional.

12. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

- a)** No processo de submissão, deverão ser inseridos os **nomes completos dos autores** (no máximo oito), **número identificador (ID) do ORCID**, seus endereços institucionais e o *e-mail* do autor indicado para correspondência.
- b)** Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: *Abstract*, *Keywords*, Introdução, Material e métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.
- c)** O título, com no máximo vinte palavras, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras.
- d)** O *Abstract* (200 a 300 palavras), deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis *keywords* (recomenda-se não utilizar as palavras do título) deverão ser acrescentadas ao final do *abstract*.
- e)** Os artigos deverão ter de 12 a 20 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no *Word*, ou compatível, utilizando fonte *Times New Roman*, tamanho 12.
- f)** O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.
- g)** O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do *Word*.
- h)** Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados.
- i)** As figuras e as tabelas não deverão ultrapassar 17 cm de largura.
- j)** As figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravadas no formato jpg ou png. Ilustrações em cores serão aceitas para publicação.
- k)** Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.
- l)** As equações deverão ser editadas utilizando o *Equation Built* do *Word*.
- m)** As variáveis deverão ser identificadas após a equação.
- n)** Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão para fatores quantitativos.
- o)** Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.
- p)** A revista aceita um índice máximo de 5% de autocitações e, ainda, recomenda que oitenta por cento (80%) das referências bibliográficas sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge*, *Scopus* ou *SciELO* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência às citações de artigos internacionais. Não serão aceitas nas referências citações de monografias, dissertações e teses, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.
- q)** As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Para citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); **para dois autores**: Souza e Scapim (2005) ou (Souza & Scapim, 2005); **para três a cinco autores** (1.^a citação): Venturieri, Venturieri, e Leopoldo (2013) ou (Venturieri, Venturieri, & Leopoldo, 2013) e, nas citações subsequentes, Venturieri et al. (2013) ou (Venturieri et al., 2013); **para seis ou mais autores**, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Wayner et al. (2007) ou (Wayner et al., 2007).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados e em itálico, sem o local de publicação. As referências deverão conter o DOI.