



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

EMANUELI MARCHIORO

**INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO  
VEGETAL NA CULTURA DO MILHO**

Florianópolis  
2023

EMANUELI MARCHIORO

**INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO  
VEGETAL NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa  
Soares

Coorientador: Dra. Emanuela Pille da Silva

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marchioro, Emanuelli  
Inoculação de microrganismos promotores do crescimento  
vegetal na cultura do milho / Emanuelli Marchioro ;  
orientador, Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares,  
coorientadora, Emanuela Pille da Silva, 2023.  
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,  
2023.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Recursos Genéticos  
Vegetais . 3. Fungos micorrízico arbuscular. 4. Bactérias  
promotoras do crescimento de plantas . I. Soares, Cláudio  
Roberto Fonseca Sousa. II. da Silva, Emanuela Pille. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Emanueli Marchioro

**Inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal na cultura do milho**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 28 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Anabel González Hernández, Dr<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Elaine Martins da Costa, Dr<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. (a) Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares Dr. (a)  
Orientador (a)

Florianópolis, 2023

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, parte fundamental da minha vida, aos meus pais Idalina e Valdir, minha irmã Vanessa, que mesmo distantes sempre estiveram próximos, me incentivando e me apoiando ao longo dessa jornada.

Ao PPRGV-UFSC pela oportunidade de cursar o programa de Pós-Graduação, aos professores do RVG que contribuíram para minha formação.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Bernadete Possebon Ribas pelo auxílio e prestatividade

Ao meu orientador Cláudio R.F.S. Soares, por todo o apoio para condução da dissertação e pela confiança.

A minha coorientadora Emanuela Pille da Silva e a Dr<sup>a</sup> Anabel González Hernández pôr todo o auxílio na implantação dos experimentos e por todo ensinamento ao longo da dissertação.

Ao meu amigo Kaue Grotto, por todo o apoio e incentivo.

As estagiárias, Luiza Conceição e Ana Paula Brandão por me auxiliar na condução dos experimentos.

Aos colegas, amigos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste projeto.

A todos o meu muito obrigada!

## RESUMO

O elevado custo e impacto ambiental que a utilização da adubação mineral pode causar em sistemas agrícolas tem incentivado a busca por alternativas mais sustentáveis de produção. Uma dessas alternativas é a inoculação com microrganismos promotores do crescimento de plantas (MPCP) como fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar, em casa de vegetação e a campo, como a aplicação de inoculantes a base de BPCP e FMA atua sobre o crescimento, aspectos relacionados a atividade fotossintética, estado nutricional e rendimento de grãos da cultura do milho. Previamente foi realizado um teste de compatibilidade das BPCP (*Azospirillum brasilense*- AbV5/AbV6 e *Bacillus* spp- 31S3, 20S3, 4P3 e 1S3) para o estabelecimento dos tratamentos de coinoculação. Foram conduzidos dois ensaios empregando solo com histórico de cultivo agrícola, sendo o primeiro realizado em casa de vegetação (ENSAIO I) em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e o segundo em condições de campo (ENSAIO II) em delineamento em blocos casualizados com seis repetições. Em ambos os ensaios foram avaliados os seguintes tratamentos: 1) AbV5/AbV6 (AZO) + 50% Nitrogênio; 2) 31S3 (B1) + 50%N; 3) 20S3 (B2) + 50%N; 4) AZO+B1 + 50%N; 5) AZO+B2 + 50% N; 6) *Rizopagus intraradices* Rootella BR (RI-com) + 50% N; 7) *R. intraradices* (RI-UFSC) + 50%N. Em todos os tratamentos de inoculação simples e de coinoculação foi realizada a aplicação de N correspondente a 50% da adubação nitrogenada recomendada em cobertura (50% N). Além destes tratamentos foram avaliados três tratamentos não inoculados: 8) 0% N, 9) 50% N e 10) 100% N, cuja dose corresponde a redução na adubação de cobertura. No ENSAIO I, aos 45 dias após a emergência (D.A.E) foram avaliados os parâmetros: altura, diâmetro do colmo e aspectos relacionados à atividade fotossintética, e aos 90 dias, massa seca da parte aérea (MSPA) massa seca da raiz (MSR) e a concentração e acúmulo de N e fósforo P. No ENSAIO II aos 60 (D.A.E) determinou-se o teor de N e P e aos 120 D.A.E. Coletaram-se dados para avaliação da produtividade. No ENSAIO I o crescimento, o estado nutricional das plantas e atividade fotossintética não foram influenciados pelos tratamentos de inoculação. No ENSAIO II a coinoculação com AZO+B2 proporcionou incrementos médios de 37% no teor de N em relação ao controle (0% N) e em 24% no incremento de P em relação à (AZO) e 23% em relação à (B2). A inoculação do FMA RI-UFSC aumentou o rendimento médio de grãos em 26% em relação ao controle (0% N), Os resultados demonstram que bactérias associativas *A.brasilense* e *Bacillus* spp, podem ser compatíveis para o uso em consórcios microbianos. Adicionalmente o RI-UFSC possui a capacidade de incrementar o rendimento de grãos do milho.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras do crescimento de plantas. Fungos micorrízicos arbusculares. Produção agrícola. *Zea mays*.

## ABSTRACT

. The high cost and environmental impact that the use of mineral fertilization can cause in agricultural systems has encouraged the search for more sustainable alternatives for production. One of these alternatives is the inoculation with plant growth promoting microorganisms (PGPM) as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth promoting bacteria (PGPB). Thus, the objective of the work was to evaluate, in the greenhouse and in the field, how the application of inoculants based on BPCP and AMF acts on the growth, aspects related to photosynthetic activity, nutritional state and grain yield of corn culture. Previously, a compatibility test of PGPB (*Azospirillum brasilense*- AbV5/AbV6 and *Bacillus* sp- 31S3, 20S3, 4P3 and 1S3) was carried out to establish the coinoculation treatments. Two trials were conducted using soil with a history of agricultural cultivation, the first conducted in a greenhouse (TEST I) in a completely randomized design with six repetitions and the second under field conditions (TEST II) in a randomized block design with six repetitions. In both trials the following treatments were evaluated: 1) AbV5/AbV6 (AZO) + 50% Nitrogen; 2) 31S3 (B1) + 50% N; 3) 20S3 (B2) + 50% N; 4) AZO+B1 + 50% N; 5) AZO+B2 + 50% N; 6) *Rhizophagus intraradices* Rootella BR (RI-com) + 50% N; 7) *R. intraradices* (RI-UFSC) + 50% N. In all treatments of simple inoculation and coinoculation, N was applied corresponding to 50% of the recommended nitrogen fertilization in cover (50% N). Besides these treatments, three non-inoculated treatments were evaluated: 8) 0% N, 9) 50% N, and 10) 100% N, whose dose corresponds to a reduction in the cover application. In Trial I, at 45 days after emergence (D.A.E.) the following parameters were evaluated: height, diameter of the stem and aspects related to photosynthetic activity, and at 90 days, aboveground dry mass (ADM), root dry mass (RDM) and the concentration and accumulation of N and phosphorus P. In Trial II at 60 (D.A.E.) the content of N and P were determined and at 120 D.A.E. data were collected to evaluate the productivity. In TEST I growth, nutritional state of the plants and photosynthetic activity were not influenced by inoculation treatments. In TEST II, co-inoculation with AZO+B2 provided average increments of 37% in N content compared to control (0% N) and 24% in P increment compared to (AZO) and 23% compared to (B2). Inoculation of the RI-UFSC AMF increased average grain yield by 26% over the control (0% N), The results demonstrate that associative bacteria *A. brasilense* and *Bacillus* spp, can be compatible for use in microbial consortia. Additionally RI-UFSC has the ability to increase corn grain yield.

**Key words:** Plant growth promoting bacteria. Arbuscular mycorrhizal fungi. Crop production. *Zea mays*.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 : Precipitação, temperatura mínima, média e máxima, durante a condução do ensaio a campo para avaliação da inoculação simples e coinoculação de MPCP na cultura do milho.....36
- Figura 2: Ensaio de compatibilidade entre os isolados *A. brasilense* vs. *Bacillus* sp- 31S3 e *A. brasilense* vs. *Bacillus* sp- 20S3 (6) por meio da confrontação direta em meio de cultura sólida Ágar Nutriente por 48 horas a 25°C. .... 39
- Figura 3: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* ssp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) (A) no teor de nitrogênio (N) (n=7) e (B) fósforo foliar (P) (n=7) no milho (*Zea mays*) condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste SNK ( $p<0,05$ ). \*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p<0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média. .... 42
- Figura 4: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* ssp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) na produção de biomassa cultura do milho.\*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p<0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média. .... 43
- Figura 5: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* ssp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) no rendimento de grãos de milho (*Zea mays*) em solo não estéril em condições de campo .As médias seguidas pela mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste SNK ( $p<0,05$ ). \*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p<0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média..... 44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização química e teor de argila do solo utilizado para o crescimento do milho ( <i>Zea mays</i> ) em condições controladas.....	32
Tabela 2: Caracterização química e teor de argila do solo da área de condução do Ensaio II.....	35
Tabela 3: Efeito da inoculação e coinoculação de <i>A.brasillense</i> (AZO), <i>Bacillus</i> spp (B1 e B2) <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI-UFSC e RI-Com) na altura de plantas, diâmetro de colmo, na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) do milho ( <i>Zea mays</i> ) em solo não estéril em condições de casa de vegetação (n=6). ....	40
Tabela 4: Efeito da inoculação e coinoculação de <i>A.brasillense</i> (AZO), <i>Bacillus</i> spp (B1 e B2) <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI-UFSC e RI-Com) teor, acúmulo de fósforo (P)e nitrogênio (N), nos teores de clorofila e carotenoides.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MPCP-Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas  
BPCP-Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas  
FMA-Fungos micorrízicos arbusculares  
P-Fósforo  
N- Nitrogênio  
RG-Rendimento de grãos  
MSPA- Massa seca da parte aérea  
MSR- Massa seca da raiz  
CONAB-Companhia Nacional do Abastecimento  
EPAGRI- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão de Santa Catarina  
AIA-Ácido-indol-ácetico  
C- Carbono  
NH<sub>4</sub>- Amônia  
CO<sub>2</sub>- Dióxido de carbono  
ha- hectare  
CEPEA  
NO<sub>3</sub>-nitrato de amônio  
IFA-Internacional Fertilizer Association  
ATP- Adenosina trifosfato  
K- Potássio  
pH- Potencial hidrogeniônico  
Ca- Cálcio  
ACC- 1- aminociclopropano-1-ácido carboxílica  
FBN- Fixação Biológica de Nitrogênio  
Mg- Magnésio  
AN- Agar Nutriente

TSA- Ágar Tryptic Soy

DYGS- Dextrose Yeast Glutamato

CCB-Centro de Ciência Biológicas

UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina

MIP-Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

SC- Santa Catarina

RS- Rio Grande do Sul

UNOESC-Universidade do Oeste de Santa Catarina

UFC- Unidade Formadora de Colônias

Kg- Quilogramas

ton- tonelada

D.A.E- Dias após a emergências

NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>- Nitrato de amônio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
1.1	CULTURA DO MILHO E DEMANDA DE FERTILIZANTES .....	17
<b>1.1.1</b>	<b>Importância e demanda de nitrogênio e fósforo para a cultura do milho.....</b>	<b>18</b>
<i>1.1.1.1</i>	<i>Nitrogênio.....</i>	<i>18</i>
<i>1.1.1.2</i>	<i>Fósforo.....</i>	<i>19</i>
1.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP) ..	20
1.3	BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Azospirillum</i> .....	21
1.4	BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i> .....	23
1.5	CO-INOCULAÇÃO DE ESTIRPES DE BPCP.....	24
1.6	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES .....	26
<b>2</b>	<b>HIPÓTESEs .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
4.2	TESTE DE COMPATIBILIDADE DE MICROORGANISMOS .....	31
4.3	Ensaio de inoculação.....	31
<b>4.3.1</b>	<b>ENSAIO I (Condições Controladas) .....</b>	<b>32</b>
<i>4.3.1.1</i>	<i>Local de implantação e condução experimental .....</i>	<i>32</i>
<i>4.3.1.2</i>	<i>Avaliações.....</i>	<i>34</i>
<i>4.3.1.2.1</i>	<i>Variáveis biométricas .....</i>	<i>34</i>
<i>4.3.1.2.2</i>	<i>Teor de N e P foliar .....</i>	<i>34</i>
<i>4.3.1.2.3</i>	<i>Teor de clorofila e carotenoides .....</i>	<i>34</i>

4.4	Ensaio II.....	35
4.4.1	<b>Local de implantação e instalação do experimento .....</b>	<b>35</b>
4.4.2	<b>Avaliações .....</b>	<b>37</b>
4.4.2.1	<i>Teor foliar de N e P .....</i>	<i>37</i>
4.4.2.2	<i>Biomassa e Rendimento.....</i>	<i>38</i>
5	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>38</b>
6	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
6.1	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	39
6.1.1	<b>Variáveis biométricas .....</b>	<b>39</b>
6.1.2	<b>Teor e acúmulo de N, P, teor de clorofila e carotenoides .....</b>	<b>40</b>
6.2	ENSAIO A CAMPO.....	41
6.2.1	<b>Teor Foliar (P e N).....</b>	<b>41</b>
6.2.1	<b>Produção de biomassa .....</b>	<b>43</b>
6.2.2	<b>Rendimento de grãos .....</b>	<b>44</b>
7	<b>DISCUSSÕES .....</b>	<b>45</b>
8	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
9	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) apresenta importância no cenário mundial, devido múltiplos propósitos de uso, servindo desde fonte de alimento para humanos e animais, até matéria-prima para diversos produtos industrializados (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011). Estados Unidos, China e Brasil são os maiores produtores mundiais do milho. No Brasil este cereal é considerado um dos mais importantes produtos da agricultura com uma produção de 113 milhões de toneladas de grãos na safra de 2021/2022 (CONAB, 2023). A alimentação animal é o principal fim de utilização do cereal, sendo que a mesma representa cerca de 70 a 90% da produção nacional (CONAB, 2021).

Para que a demanda de consumo da cultura seja atendida, o sistema de produção depende do reabastecimento das reservas de nutrientes que são removidas para a manutenção ou mesmo incremento da produtividade. Atualmente, esse abastecimento é efetuado por meio da adição de fertilizantes químicos. Dentre os fertilizantes químicos, os nitrogenados e fosfatados destacam-se pelo seu uso intensivo. No entanto, estes fertilizantes apresentam uma baixa eficiência de aproveitamento pelas plantas, resultando em altas taxas de aplicação com consequente degradação do meio ambiente.

Diante do exposto, há uma demanda por sistemas agrícolas que preconizam a sustentabilidade e agregação de valor aos seus produtos. Entre as alternativas para atender esta demanda destaca-se a utilização de produtos biológicos. A adoção destes insumos viabiliza a substituição parcial de fertilizantes químicos minerais, impactando diretamente na reversão do custo de produção. Dentre os insumos biológicos destaca-se o uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas (MPCP).

Dentro do grupo de MPCP, bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* promovem o crescimento das plantas por meio da fixação de nitrogênio (N), solubilização de fosfatos, aumento na aquisição de ferro, além da produção de fitohormônios, como o ácido indol-ácetico (AIA) (ÂNGULO et al., 2014) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) principalmente pelo aumento na absorção de água e fósforo (P) (SHITH; READ, 2008). Eles têm sido utilizados como inoculantes de sementes na cultura do milho, trigo, arroz e pastagens. Estes microrganismos apresentam um metabolismo versátil, além de serem bem adaptados no competitivo ambiente da rizosfera. A inoculação MPCP tem demonstrado auxiliar no

crescimento de culturas agrícolas, influenciando positivamente o incremento no rendimento de grãos e na redução do uso de fertilizantes minerais (MALUSÀ, 2016).

Com a forte difusão dos benefícios da inoculação individual com *Azospirillum* e *Bacillus* em culturas agrícolas como o milho, estudos têm sido estimulados visando uso de inoculantes a base de mais de um microrganismo (coinoculação). Essa estratégia tem o potencial de aumentar os benefícios para a cultura agrícola de interesse. Por exemplo, há uma adoção crescente da coinoculação de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* por produtores de soja no Brasil nos últimos anos. Os resultados desta inoculação têm resultado em maior nodulação da soja, rendimento e teor de N nos grãos (SILVA et al., 2019; BARBOSA et al., 2021). Outro exemplo de sucesso no Brasil é o uso de inoculantes comerciais a base de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (Abv5 e AbV6), bem como a base de duas estirpes de *Bacillus* (*B. subtilis* e *B. megaterium*) que são recomendados para gramíneas economicamente importantes, como o milho (DE SOUZA et al., 2021).

Além da aplicação das bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), os FMA são capazes de promover o crescimento vegetal e tem aplicação em inoculantes comerciais para a cultura do milho. Estudos com *Rhizophagus intraradices* mostram efeitos da inoculação dessa espécie no crescimento de plantas de soja, trigo e milho ( ARDAKANI et al., 2011, GUO et al., 2014 SPAGNOLETTI e LAVADO, 2015; STOFFEL, 2020), favorecendo, de uma forma geral, a nutrição e o crescimento de plantas por diferentes mecanismos.

Considerando que a resposta da inoculação depende das características genéticas do microrganismo e da planta simbiote. Dessa forma é necessário a condução de estudos de novos isolados dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* obtidos de diferentes condições ambientais, como forma de explorar a diversidade genética e potencial tecnológico dos MPCP. Adicionalmente, acompanhar o efeito da aplicação desses insumos biológicos também é importante, com fins de elucidar os efeitos desses microrganismos e apresentar novas alternativas para a agricultura.

Assim, este estudo teve como objetivo verificar a compatibilidade de estirpes de bactérias associativas do gênero *A. brasilense* e *Bacillus* spp e avaliar os efeitos da inoculação com microrganismos promotores do crescimento de plantas em variáveis nutricionais, nas características relacionadas à atividade fotossintética e parâmetros produtivos da cultura do milho.



## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 CULTURA DO MILHO E DEMANDA DE FERTILIZANTES

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família das Gramíneas, sendo o seu centro de origem a América Central, há 10 mil anos atrás (YU et al., 2006). Apresenta adaptação a diferentes condições agroclimáticas, permitindo que seja cultivado em 160 países. A cultura do milho apresenta exigências edafoclimáticas durante o seu ciclo de desenvolvimento, como faixa de temperatura ideal do solo entre 15 e 30 °C e 600 mm de água em todo o seu ciclo (SANGOI; SILVA E ARGENTA, 2010).

Em termos fisiológicos, o milho é uma espécie anual, monóica, pertencente ao grupo das plantas C4, com alta taxa fotossintética líquida e alta afinidade de CO<sub>2</sub>. Apresenta um padrão geral de desenvolvimento para todos os genótipos, cada planta desenvolve de 20-21 folhas totais, floresce cerca de 65 dias após a emergência e atinge sua maturidade fisiológica cerca de 125 dias após a emergência (RITCHIE et al., 2003; MARAG e SUMAN, 2018;). Os grãos são compostos por 75% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo (PÃES, 200). Por estas características o cereal apresenta importância econômica e com alta produção mundial.

O milho é considerado um dos três cereais mais produzidos no mundo, sendo que os Estados Unidos, China e Brasil, produziram 64% de 1,11 bilhões de toneladas na safra 2019/20. Dentro do cenário mundial de produção, o Brasil destaca-se como o terceiro produtor mundial com produção na safra 2021/22 de 113 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 22.036 mil hectares (CONAB, 2023). Os principais estados produtores do cereal são os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, somando 57% da produção nacional. Somente a região Sul do Brasil nos últimos quatro anos produziu aproximadamente 10,5 milhões de toneladas. No estado de Santa Catarina as microrregiões de Joaçaba, Curitiba, Canoinhas e Xanxerê, alcançaram produtividade média superior a 10 t ha<sup>-1</sup>(EPAGRI, CEPEA. 2021).

No Brasil, a maior parte da produção deste grão (70 a 85 %) é destinada para a fabricação de ração animal e cerca de 15% são utilizadas como matéria-prima para alimentação

humana, além da aplicação na indústria têxtil, química e produção de biocombustíveis (PÃES, 2006; RANUM et al., 2014). Para a manutenção ou incremento da produtividade, é necessário realizar o fornecimento constante de nutrientes, que são removidos a cada ciclo do sistema solo-planta. Dentro da produção agrícola, esse fornecimento é efetuado por meio da adição de fertilizantes, principalmente minerais, dentre estes destacam-se os fertilizantes nitrogenados e fosfatados (MOTES, 2010). Estima-se que na safra de 2021/2022 foram utilizados mundialmente, aproximadamente, 200 milhões de toneladas de fertilizantes, sendo 111 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados (IFA, 2020).

### **1.1.1 Importância e demanda de nitrogênio e fósforo para a cultura do milho**

#### *1.1.1.1 Nitrogênio*

O nitrogênio é considerado um elemento químico essencial para o desenvolvimento vegetal, pois é constituinte de moléculas que desempenham funções no metabolismo das plantas. É um elemento integrante de todos os aminoácidos, fazendo, conseqüentemente, parte da constituição de proteínas (80 a 85% do N total), bem como de enzimas, fitocromos, coenzimas, ácidos nucléicos, clorofila e fitohormônio (ANDRADE et al., 2003; TAIZ e ZEIGER, 2004; FOSS, 2006; BISSANI et al., 2008). Sua atuação direta no desenvolvimento vegetal faz que seja um dos nutrientes mais requeridos no sistema solo-planta.

Para culturas de interesse agrícola como o milho, estima-se que são extraídos 100 kg N ha<sup>-1</sup> para produzir 5,8 ton ha<sup>-1</sup> de grãos. No que se refere à exportação do nutriente, cerca de 70 a 77 % são transcoladas para os grãos (COELHO e FRANÇA, 1995). Em virtude da alta extração o sistema solo-planta necessita de reposição constante deste nutriente para suprir a demanda das plantas. Com a expansão da agricultura e com a revolução verde na década de 1970, a utilização de fertilizantes minerais nitrogenados é a via mais utilizada para fornecer este elemento e alcançar maiores produtividades. Essa reposição dentro do sistema agrícola da cultura do milho é realizada por meio da aplicação de fertilizantes nitrogenados compostos predominantemente de NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> e ureia (GRANT et al., 2012).

No entanto, a adubação nitrogenada possui limitações econômicas e ambientais relacionadas ao alto custo de produção devida a dependência externa de muitos países para o abastecimento destes fertilizantes. Como por exemplo o Brasil que importa mais de 70 % de fertilizantes nitrogenados. Assim como a baixa eficiência de uso de fertilizantes nitrogenados pelas plantas, essa baixa eficiência de absorção dos compostos nitrogenados resulta na absorção de apenas 50 %. A baixa eficiência de absorção pelas plantas pode estar relacionada com os processos de perdas que o N pode sofrer no ambiente por meio da volatilização amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) imobilização, mobilização, nitrificação, desnitrificação e mineralização (REETZ, H. F 2017). Essas perdas impactam diretamente na poluição ambiental, tornando os solos agrícolas principais fontes de emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  para atmosfera. Além do impacto econômico uma vez que as aplicações de fontes de nitrogênio representam 40 % do custo total de produção da cultura do milho (SIGNOR, CERRI, CONANT, 2013).

#### *1.1.1.2 Fósforo*

O fósforo (P) é considerado um elemento essencial para o desenvolvimento vegetal, assim como o N e o K, e está envolvido na maioria dos processos bioquímicos. O P apresenta papel importante na produção de energia (ATP), para o funcionamento das células, sendo assimilado pelas plantas como íons de fosfatos, sendo incorporados diretamente em compostos orgânicos nas plantas. A exigência de P em culturas agrícolas como o milho é inferior quando comparado com N e K, mas normalmente as doses recomendadas são altas, em função da sua baixa eficiência (20 a 30%) de aproveitamento desse nutriente pela cultura (BASTOS et al., 2008). Isso é consequência da alta capacidade de adsorção do P aos constituintes do solo, o que reduz a sua disponibilidade (CORRÊA et al., 2008).

Dentre os fatores que podem afetar a disponibilidade desse nutriente para as plantas, destaca-se a acidez do solo. Em solos ácidos, o P liga-se fortemente às partículas de argila, e em pH básico, este elemento liga-se a moléculas de Ca. Além do pH do solo, a própria característica química do P também influencia na baixa disponibilidade desse elemento, uma vez que o P inorgânico presente nos solos tem baixa solubilidade em água e forte interação com partículas de argila (KLEIN e AGNE, 2012). Essas partículas de argila possuem óxidos de ferro

e alumínio com carga positiva, que se ligam ao P com conseqüente redução na disponibilidade na solução do solo para as plantas, (MACHADO e SOUZA, 2012). A baixa absorção de P também pode ser conseqüência da resistência mecânica do solo compactado, pois a compactação dificulta a penetração das raízes no solo, e como o P movimenta-se por difusão no solo, as raízes não conseguem interceptá-lo (NOVAIS e SMYTH, 1999)

Devido a esses fenômenos, frequentes aplicações de fertilizantes a base de P em solos agrícolas são realizadas. A principal matéria-prima da indústria utilizada na produção de fertilizantes fosfatados é a rocha fosfática. Três países são responsáveis por 73% da extração desse material, a China, Estados Unidos e Marrocos. Neste cenário, o Brasil é responsável por apenas 3% do total explorado mundialmente (BRASIL, 2016). Devido à baixa produção dos fertilizantes minerais fosfatados, o Brasil depende da importação para suprir a demanda interna desses fertilizantes. Neste contexto, assim como é destacado anteriormente para os fertilizantes nitrogenados é necessário reavaliar a utilização dos fertilizantes fosfatados nos sistemas de produção agrícola, buscando minimizar os impactos negativos ao meio ambiente e a dependência externa (HIREL et al., 2001).

Uma alternativa eficiente para reduzir a utilização de fertilizantes químicos é a utilização de fontes biológicas. Uma fonte biológica de destaque nos últimos anos são os inoculantes formulados a partir de microrganismos benéficos associativos e mutualísticos como as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Esses microrganismos são capazes de colonizar a rizosfera ou o interior das plantas, podendo-se manter ou até mesmo aumentar a produtividade de culturas agrícolas, apresentando-se como uma prática sustentável nos sistemas produtivos.

## 1.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

Bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) são um grupo heterogêneo de bactérias benéficas de vida livre. Apresentam alta afinidade de ocupação do ambiente rizosférico (zona de interseção solo e planta) e endofítico (tecidos vegetais internos) (ZAMIOUDUS et al., 2013). A interação entre BPCP e as plantas decorrem inicialmente da

liberação de substância pelas raízes que atraem as BPCP para a rizosfera. Posteriormente, estas podem colonizar e se estabelecerem somente nas raízes e/ou os tecidos internos da planta e, desse modo, influenciam o crescimento vegetal via mecanismos diretos ou indiretos (BABALOLA, 2010; CARDOSO et al., 2011).

Os mecanismos diretos consistem na capacidade das BPCP atuarem nos processos fisiológicos das plantas, como biofertilizantes e estimulantes, incluindo a capacidade de solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios, produção de sideróforos e regulação nos níveis de etileno por meio da produção da enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (ACC deaminase). Os mecanismos indiretos incluem a capacidade de biocontrole, pela produção de antibióticos, produção de enzimas com potencial de inibição, remoção de substâncias tóxicas e competição por nutrientes com fitopatógenos (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

A influência das BPCP em favorecer promover o desenvolvimento e o crescimento vegetal pode ocorrer por meio das combinações dos mecanismos diretos e indiretos. Estes microrganismos podem ser apresentar efeitos adicionais aos fertilizantes químicos aplicados, com consequentes benefícios para o rendimento das culturas (HAYAT et al., 2010). Na literatura, diversos gêneros de BPCP são descritos com potenciais inoculantes, destacando-se *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, (MONTEIRO et al., 2010). BPCP dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* vêm se tornando objeto de estudo, devido a sua capacidade de promoção do crescimento. Formulações comerciais, a base destes gêneros vem sendo empregados estimulando adoção em novas estratégias para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e menos dependente de fertilizantes químicos (ICHIWAKI, 2012).

### 1.3 BACTÉRIAS DO GÊNERO *AZOSPIRILLUM*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são alfa-Proteobactérias, Gram-negativas e de vida livre, caracterizadas pelo formato de bastonetes, uniflageladas, com movimento fibróide característico e padrão flagelar misto (HALL e KRIEG, 1984). Estas são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, sendo isoladas da rizosfera de gramíneas e

cereais em várias regiões do mundo, em clima tropical e temperado (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Entretanto, possuem a capacidade de infectar e colonizar o interior das plantas, sendo também consideradas como bactérias endofíticas facultativas.

A interação entre raízes e as bactérias do gênero *Azospirillum* influenciam positivamente o desenvolvimento das plantas, sendo que esse efeito pode ser atribuído aos mecanismos de promoção de crescimento, o que inclui fixação biológica de nitrogênio (FBN), síntese de fitohormônios (FUKAMI et al., 2017), solubilização de fosfatos (TURAN et al., 2012) e indução de tolerância a estresse abióticos e bióticos (SANTOS et al., 2019). *Azospirillum* é capaz de fixar biologicamente o nitrogênio, transformando o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em uma forma assimilável às plantas o  $NH_4$  (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além da FBN, o gênero tem demonstrado potencial de modulação dos níveis de hormônios vegetais como as auxinas. Estudos demonstram que produção bacteriana de substâncias reguladoras do crescimento, desempenham papel central na regulação do desenvolvimento vegetal, determinando a arquitetura das plantas, promovendo maior crescimento radicular, formação de raízes laterais e aumento no número de pelos radiculares (STEENHOUNT; VANDERLEYDEN, 2000; SANTI et al., 2013).

O mecanismo de FBN realizado pelas bactérias do gênero *Azospirillum*, foi de suma importância para a seleção de espécies eficientes pertencentes a este gênero, sendo atualmente a espécie *A.brasilense*, a mais estudada, e uma das pioneiras na formulação inoculantes comerciais para gramíneas no mundo. No Brasil, pesquisadores da Embrapa Soja (HUNGRIA, 2011) comprovaram que estirpes de *A.brasilense* apresentaram capacidade na promoção de crescimento, incremento na produtividade do milho em até 30 % em relação ao controle não inoculada. Com o resultado desses estudos algumas estirpes como AbV5 e AbV6 têm sido utilizadas na formulação de inoculantes para a cultura do milho. Essas estirpes também demonstram eficiência agrônômica o para trigo. Estes efeitos têm sido atribuídos à síntese de fitohormônios, que beneficiam, o crescimento radicular, com conseqüente, aumento na absorção de água e nutrientes (HUNGRIA et al., 2010). Esses mecanismos refletem positivamente no aumento da produtividade e na redução do uso de fertilizantes nitrogenados para essas culturas. A aplicação destas estirpes possibilita o rendimento de grão de milho até 8.000 kg ha<sup>-1</sup> com aplicação de apenas 50% da dose recomendada de fertilização nitrogenada em cobertura (HUNGRIA, 2010).

No contexto econômico, a associação entre as estirpes de *Azospirillum* e a cultura do milho, apresenta fatores que favorecem a sua utilização na agricultura brasileira. Dentre esses fatores destaca-se a redução da aplicação de fertilizantes minerais. Considerando a área de cultivo de milho 18,88 milhões de hectares (safra 2019/2020) (CONAB, 2020) a uma redução de 25% do uso de fertilizantes nitrogenados, com uma estimativa de preço de US\$ 1,00 por kg de N, proporcionaria a economia de US\$ 440 milhões por ano (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2020).

No entanto, bactéria do o gênero *Azospirillum* apresentam suscetibilidade às condições climáticas, estresse hídrico, salinidade, sistemas de manejo do solo, o que pode reduzir a interação planta -bactéria e a presença de células viáveis aderidas às sementes quando realizada a inoculação. Dessa forma, o uso de inoculantes contendo BPCP produtoras de endósporos como as do gênero *Bacillus* spp, apresentam-se como uma alternativa promissora. Isto se deve ao fato de esta estrutura conferir maior sobrevivência no ambiente, permitindo adaptações as condições de estresse abióticos como temperatura, pH, ou exposição a metais pesados, além de apresentar vida útil prolongada quando armazenadas em formulações comerciais (BAHADIR et al., 2018).

#### 1.4 BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS*

O gênero *Bacillus* é composto por mais de 60 espécies pertencentes à família *Bacillaceae*, são Gram-positivas, formadoras de endósporos, quimioheterotróficos, móveis rodeados de flagelos, podendo ser anaeróbias ou aeróbias facultativas. As células bacterianas deste gênero apresentam um tamanho que varia 0,5 a 2,5µm x 1,2-10µm, sendo isoladas comumente no solo e nas plantas (MANDIC-MULEC et al., 2015; VERBAENDERT & DE VÓS, 2011). O gênero vem ganhando destaque como BPCP, em razão das características multifuncionais dos seus mecanismos de ação, como a solubilização de fosfatos, a produção de AIA, sideróforos, fixadoras de N atmosférico e capacidade de biocontrole de patógenos de plantas (WAHYUDI et al., 2011; BAHADIR et al., 2018)

A multifuncionalidade do gênero pode promover efeitos no desenvolvimento de culturas agrícolas, como o milho. Estirpes do gênero *Bacillus*, quando inoculados no milho, mostraram

efeitos significativos na altura, acúmulo de massa seca, teor de clorofila e teor de nitrogênio (LOBO, 2018). De acordo com Balbinot (2018), plantas inoculadas com isolados de *Bacillus* na ausência de N apresentaram altura média semelhante às plantas não inoculadas e com a aplicação de 50% e 100 % da recomendação de adubação nitrogenada

Além dessas características, esse gênero é considerado um dos mais estáveis no ambiente, apresentando maior resposta adaptativa pela sua capacidade de formação de endósporos, produção de enzimas e antibióticos, que permitem a adaptação às condições abióticas extremas (JOUNG e CÔNTÉ, 2002). Estirpes bacterianas deste gênero têm sido isoladas da rizosfera de plantas crescidas em ambientes degradados, contaminados com metais pesados, e com baixa disponibilidade de água e apresentam efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal (GHYSELINCK et al., 2013; PINTER et al., 2017; TIWARI et al., 2019).

Estudos do grupo de pesquisa de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) verificaram que bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de ambientes degradados foram capazes de produzir substâncias reguladoras do crescimento vegetal como AIA, ACC-desaminase, e a capacidade de solubilização de fosfatos e produção de sideróforos. Também promoveram o crescimento e sobrevivência de mudas da espécie arbórea *Mimosa scabrella* cultivadas em solo proveniente de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. (SILVA, 2020). A combinação dos mecanismos de ação e a capacidade de sobreviver em condições adversas, sugerem que as estirpes gênero *Bacillus* são candidatas promissoras para a formulação de inoculantes, para aplicação na agricultura. Assim como sua utilização em consórcios microbianos, com estirpes de outros gêneros de BPCP como as *Azospirillum*, afim de potencializar os benefícios individuais de cada estirpe.

### 1.5CO-INOCULAÇÃO DE ESTIRPES DE BPCP

O uso combinado de diferentes estirpes com comprovada eficiência para o crescimento vegetal, pode acarretar em um efeito sinérgicos, com conseqüente aumento dos benéficos quando aplicados isoladamente (ADESEMOYE et al., 2008). Segundo Bárbaro et al. (2008), a técnica de coinoculação ou inoculação mista consiste na utilização de combinações de



diferentes microrganismos, que produzem efeitos sinérgicos múltiplos, com vantagens competitivas, superando os resultados produtivos quando usados na forma isolada. No entanto, certos cuidados devem ser tomados na seleção de estirpes para a formulação de inoculantes mistos. A compatibilidade entre os microrganismos que constituem uma formulação é crucial, a fim de alcançar maior amplitude da resposta esperada pela aplicação do inoculante (GOTTLIEB, 1973; DROZDOWICZ, 1997).

A técnica alternativa de coinoculação de BPCP em leguminosas é sugerida para potencializar a nodulação, aumentar o crescimento de plantas e favorecer o processo de FBN. De acordo com Araújo e Hungria (1999) a coinoculação de *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja, promoveu aumento na nodulação e produtividade de grãos. Resultados semelhantes foram observados por Costa (2014) quando coinocularam as estirpes CB-6 (*Enterobacter sp*) e UFLA 214 (*Azospirillum brasilense*) com BR 29 (*B.elkanii*), com que relatam o aumento do número e a matéria seca de nódulos. Estudos verificaram que associação entre *Bradyrhizobium japonicum* e *A.brasilense* (estirpes AbV5 e AbV6), aplicados no sulco ou no tratamento de sementes, resultou no aumento do número total de nódulos e no peso de mil grãos, 16 e 14% respectivamente, em comparação com o tratamento controle sem inoculação e com adubação nitrogenada. Isto reflete a capacidade destas bactérias em promover maior desenvolvimento da cultura da soja, e no rendimento de grãos (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2013; BRACCINI et al., 2016).

Neste, a coinoculação com dois ou mais microrganismos pode ser uma alternativa para atender a demanda mundial de produção de alimentos e potencializar aos benefícios da FBN em gramíneas. Estudos têm demonstrado que a coinoculação com (*A. amazonense*, *A. lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*) aumenta concentração de N nas plantas e nos grãos de milho, quando comparadas com as médias dos tratamentos sem inoculação (DARTORA et al, 2013). Segundo Ribeiro et al., (2022), a coinoculação de estirpes de *Azospirillum spp* + *Bacillus spp*, promoveu alterações na morfologia radicular de cultura do milho, apresentando aumento no comprimento da raiz, na superfície radicular e aumento na solubilização de fosfato de ferro e de cálcio. Os mesmos autores verificam que, independentemente da fonte de adubação fosfatadas, a coinoculação promoveu aumento de 32% no peso seco de raiz 17 % na biomassa quando comparado aos tratamentos controles.

Outro exemplo de sucesso de coinoculação no Brasil é o uso de inoculantes comerciais com duas linhagens de *A. brasilense* (AbV5 e AbV6) que é aplicado em gramíneas economicamente importantes como o milho e em coinoculação de leguminosas. No entanto, há informações limitadas sobre a coinoculação com outras estirpes de BPCP indicando a necessidade de realizar estudos com finalidade de avaliar a compatibilidade de outras estirpes de BPCP, como por exemplo as do gênero de *Bacillus* spp e da espécie *A. brasilense* em outras culturas de interesse agrônomo, como o milho. Adicionalmente é necessário avaliar os efeitos da coinoculação nas características fisiológicas, nutricionais e produtivas da cultura, para subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias de formulações de inoculantes, visando uma produção agrícola sustentável. (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA et al., 2013 RIBEIRO, 2018. BARBOSA et al, 2021).

## 1.6 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao Filo *Glomeromycota*, apresentam micélio cenocítico (asseptados) e colonizam as raízes de plantas de quase todos os gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, estabelecendo simbiose com mais de 80% das famílias de plantas (SMITH & READ, 2008). São fungos biotróficos obrigatórios de reprodução assexual, estabelecendo uma simbiose mutualística com os seus hospedeiros, que dependem de outros organismos simbióticos compatíveis para sua sobrevivência e reprodução (SCHUBLER et al., 2001).

Os FMA são considerados cosmopolitas e sua ocorrência tem sido registrada, desde as regiões árticas até os trópicos, colonizando raízes de plantas nativas e cultivadas (Siqueira et al., 2002). Segundo Allen (1992), esses fungos têm importância econômica, pois colonizam espécies das principais culturas agrícolas, nas mais diversas regiões temperadas e tropicais. Esses fungos têm por característica colonizar as células do córtex nos espaços inter e intracelulares, formando estruturas denominadas arbúsculos. Essas estruturas são formadas por hifas altamente ramificadas que permitem a troca de nutrientes e metabólitos entre os simbioss. Durante o processo de estabelecimento dos FMA ocorre uma intensa diferenciação celular coordenada pelos parceiros (fungo e planta) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os

imesmos autores destacam que a relação é obrigatória para o fungo, enquanto para os seus hospedeiros é facultativa, e seu desenvolvimento é independente da presença ou não do fungo.

O estabelecimento da associação micorrízica ocorre por meio de propágulos de FMA presentes no solo (esporos, hifas e fragmentos de raízes micorrizadas). A penetração das hifas no tecido cortical é realizada por meio de estruturas denominadas “apressórios”, cuja infecção atinge o córtex primário das raízes laterais finas. Nos espaços intracelulares da região cortical as hifas incham formando as “vesículas”, órgãos de armazenamento de substâncias nutritivas. Quando as hifas se ramificam intracelularmente ocorre a formação de arbúsculos, por meio dos quais ocorre a transferência de nutrientes do fungo para a planta e vice e versa. (HAYMAN, 1978).

Nesta relação mutualística há o estabelecimento da troca de nutrientes entre simbioses, em que o FMA transfere moléculas de água, sais minerais e íons para a planta simbioses, enquanto a planta fornece fotossintatos para o fungo (SMITH & READ, 2008). Dentro deste contexto, a associação micorrízica proporciona um aumento na absorção de água e nutrientes, por meio da sua rede de hifas que se estendem para regiões mais afastadas do sistema radicular. Neste caso há o favorecimento da aquisição de nutrientes pouco móveis no solo como é o caso do P, beneficiando a absorção de água e nutrientes, principalmente o P (JALONEN et al., 2013). Adicionalmente o estabelecimento desta interação possibilita a estimulação da atividade metabólicas de outros microrganismos presentes na rizosfera (RILLIG et al., 2004).

Estudos destacam que os FMA promovem benefícios como incremento no crescimento, resistência a fitopatógenos, na tolerância a estresse hídricos e salinos e acúmulo de nutrientes. Considerando a importância da associação micorrízica para ciclagem de nutrientes no ecossistema terrestre, estudos têm sido realizados a fim de compreender os benefícios desta relação para a produção vegetal de culturas de interesse agrônômico.

Pesquisas relatam que a inoculação com FMA com FMA incrementa biomassa aérea e radicular, favorece o acúmulo de nutrientes como N, P, K, Ca e Mg em culturas como a braquiária, sorgo, soja e milho (MIRANDA, 2008). De acordo com Campos et al., (2010) a inoculação de FMA nativos, proporcionou aumento na matéria seca do milho. O comportamento semelhante foi observado em estudo realizados por Stoffel et al., (2020) em que inoculação de plantas de milho com produto comercial *Rhizophagus intraradices*, proporcionou aumento de 48% na biomassa total independente da dose de P aplicada.

Adicionalmente constatou-se que a inoculação deste produto comercial proporcionou incrementos de 32% a 54 % no rendimento de grãos de milho em ensaios a campo com diferentes características edafoclimáticas (STOFFEL et al., 2020).

No mercado estão disponíveis inoculantes à base de FMA, recomendados para as mais variadas culturas agrícolas (soja, tomate, lentilha, entre outras) (MYKE<sup>®</sup> PRO PRODUCTS, 2022). Merece destaque espécie *Rhizophagus intraradices*, presente em muitos produtos comerciais de forma pura ou em mistura. No Brasil até o momento existem sete inoculantes a base de FMA comercializados e com registro junto Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Dentre estes o primeiro inoculante com registro no MAPA consiste no produto comercialmente chamado de Rootella BR e Rootella BR Ultra, tendo como base propágulos da espécie de FMA *R. intraradices* (STOFFEL et al., 2020). Devido a expansão do uso de produtos biológicos para o desenvolvimento sustentável, são necessários estudos para introduzir, manter e viabilizar o uso de inoculantes em sistemas de produção, visando garantir maiores rendimentos para uma produção agrícola mais sustentável.

## **2 HIPÓTESES**

As estirpes de *A.brasilense* e *Bacillus* spp apresentam compatibilidade, apresentando potencial para o uso na coinoculação.

A inoculação de microrganismos promotores do crescimento de plantas tem efeito sinérgico para o milho, resultando em melhorias nutricionais e de rendimento da cultura

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a compatibilidade entre estirpes de bactérias associativas do gênero *A.brasilense* e *Bacillus* spp e os efeitos da inoculação com microrganismos promotores do crescimento de plantas em variáveis nutricionais, nas características relacionados à atividade fotossintética e parâmetros produtivos da cultura do milho.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a compatibilidade entre as estirpes bacterianas do gênero *A.brasilense* e *Bacillus* spp em condições *in vitro*

Avaliar os efeitos da inoculação de MPCP sobre variáveis biométricas, características relacionadas à atividade fotossintética e absorção de nutrientes na cultura do milho em condições de casa de vegetação;

Verificar em condições de campo o efeito da inoculação com MPCP sobre a absorção de nutrientes e produtividade da cultura.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Bactérias endofíticas e rizosféricas pertencentes ao gênero *Bacillus*, isoladas do solo e folhas de *Mimosa scabrella* em estudo realizados por Silva (2020) foram empregadas no presente estudo, sendo estas: 31S3, 20S3 e 1S3 (rizosféricas) e 4P3 (endofíticas). Duas estirpes de *A.brasilense* (AbV5 e AbV6) foram também utilizadas, sendo esta cedidas gentilmente pelo Laboratório de Biologia Molecular e Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSC. Os FMA utilizados no presente estudo provem de um produto comercial Rootella® a base de *Rhizophagus intraradices* (RI-Com) e da coleção de FMA do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB) da UFSC, sendo este um inóculo autóctone de área de mineração de carvão da região carbonífera do estado

de Santa Catarina (RI-UFSC). As principais características dos MPCP utilizados no presente estudo são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Principais características dos microrganismos promotores do crescimento vegetal selecionados para os ensaios em casa de vegetação e a campo na promoção do crescimento vegetal da cultura do milho.

Estirpe	Abreviaturas	Espécie	ACCd*	AIA**	SP**	Local de isolamento	Autores
Ab-V5/Ab-V6	AZO	<i>A.brasilense</i>	-	+	-	Rizosfera de <i>D. decumbens</i>	Döbereiner (1976)
31S3	B1	<i>Bacillus</i> sp	+	+	+	Rizosfera de <i>M.scabrella</i>	Silva (2020)
20S3	B2	<i>Bacillus</i> sp	-	-	+	Rizosfera de <i>M.scabrella</i>	Silva (2020)
<i>R.intraradices</i>	RI-Com	<i>Rizophagus intraradices</i>	nd	nd	nd	Inoculante Comercial a base de FMA-Rotella BR	Stoffel et al., (2016)
	RI-UFSC		nd	nd	nd	Solo de áreas degradadas pela mineração de carvão	

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: \* Atividade da 1-Aminocycloproano-1-Carboxilato Desaminase; \*\* Ácido indol-acético; \*\*\* Solubilização de fosfatos; (+) positivo; (-) negativo; (nd) não determinado

As estirpes de *A.brasilense* foram reativadas em placas de Petri contendo sólido Dextrose Yeast Glutamato -DYGS (composição em g L<sup>-1</sup>: 2,0 g ácido málico; 2,0 g de glicose; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2,0 g extrato de levedura; 0,5 g de fosfato de potássio monobásico; 0,5 g sulfato de magnésio; 1,5 g de ácido glutâmico e pH 6,8 a 25 °C) e meio NFBHPN (MACHADO et al., 1991)- composição em g L<sup>-1</sup>: 0,2 g de sulfato de magnésio; 0,1

g de cloreto de sódio; 0,02 g de cloreto de cálcio; 0,056 g de ácido nitrilotriacético; 0,02 g de sulfato ferroso; 0,1 mg de biotina; 10 mL de solução de micronutrientes; 5 g de lactato, 20 mL de cloreto de amônia; 50 ml de mistura de fosfatos; 1 mL de estreptomicina; 1 mL de ácido nalidixico . As estirpes de *Bacillus* spp foram reativadas em meio Ágar nutriente (composição em g L<sup>-1</sup>: 1,0 g de extrato de carne; 1,0 g de extrato de levedura; 2,0 g de peptona; 5,0 g cloreto de sódio; 15 g ágar, pH 6,8 a 25 ° C), Após crescimento das colônias e confirmação da pureza das culturas, os isolados foram utilizados para realização dos estudo de compatibilidade e de inoculação no milho.

#### 4.2 TESTE DE COMPATIBILIDADE DE MICRORGANISMOS

A fim de selecionar combinações microbianas compatíveis para a coinoculação, as quatro estirpes de *Bacillus* e as duas estirpes de *A. brasilense* foram submetidas ao teste de antagonismo *in vitro*. Para tanto, foi utilizado o método de confrontação direta dos isolados por meio de método de inibição simultânea Sanders (2012); Molina-Romero et al., (2017). Foram confrontadas as seguintes estirpes: AbV5 vs 31S3; AbV5 vs 2023; AbV5 vs 4P3; AbV5 vs 1S3; AbV6 vs 20S3; Ab-V6 vs 31S3; AbV6 vs 4P3; AbV6 vs 1S3.

Todos os isolados foram crescidos em meio líquido DYGS, incubados a 25 °C por quatro dias a 150 rpm. A confrontação dos isolados foi realizada por meio da adição de: 100 µL de uma cultura bacteriana a qual foi uniformemente espalhada em placa de Petri contendo meio Ágar Nutriente, seguida da adição de 20 µL no centro da placa do isolado bacteriano a ser confrontado. As placas foram incubadas em câmara de crescimento 25°C, por até 48 horas, sendo as análises realizadas em duplicatas. O antagonismo entre as estirpes pode ser avaliado pela formação de um halo ao redor da cepa produtora de compostos inibitórios.

#### 4.3 ENSAIOS DE INOCULAÇÃO

Posteriormente, foram conduzidos ensaios em condições de casa de vegetação (ENSAIO I) a fim de verificar a influência da inoculação dos MPCP selecionados nos

parâmetros biométricos, nutricionais e teores de clorofila e carotenoides em plantas de milho. Adicionalmente, foi conduzido um ensaio a campo no qual se avaliou o efeito da inoculação destes microrganismos nos parâmetros produtivos e nutricionais da cultura do milho (ENSAIO II).

### 4.3.1 ENSAIO I (Condições Controladas)

#### 4.3.1.1 Local de implantação e condução experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do LAMPB/UFSC no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB-UFSC). Para tanto foram utilizadas sementes do híbrido comercial AGROESTE® AS1757PRO3 e solo não estéril proveniente de área agrícola (27° 07' 56.73" S 51°43' 11.77" O). O solo, classificado como Cambissolo Háptico Ta Eutrófico o qual foi coletado na camada 0-20 cm e peneirado (4 mm) e acondicionado em vasos de 5 L. A caracterização química do solo foi realizada pelo Laboratório de Solos da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), de acordo com as metodologias proposta pela COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO- RS/SC (2004) e é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização química e teor de argila do solo utilizado para o crescimento do milho (*Zea mays*) em condições controladas.

<b>P</b>	<b>K</b>	<b>MO</b>	<b>pH</b>	<b>Índice</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
<b>mg dm<sup>-3</sup></b>		<b>%</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sup>3</sup></b>	<b>SMP<sup>3</sup></b>		<b>cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup></b>
6,21 (baixo)	109,53 (alto)	3,84 (Média)	5,62	5,96	6,84	1,79
<b>H+Al</b>	<b>CTC pH 7,0</b>	<b>% da saturação da CTC pH 7</b>		<b>Argila</b>		
<b>cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup></b>		<b>Base (V%)</b>		<b>%</b>		
4,57	13,48	66,12		27,9 (classe 3)		

Fonte: Elaborada pelo Autor deste trabalho (2023).



Em cada vaso foram adicionadas três sementes de milho híbrido AGROESTE® AS1757PRO3. Após a emergência das plântulas realizou-se mantendo apenas uma planta por vaso. Para composição dos tratamentos foram utilizados os MPCP apresentados no item 4.1, conforme segue: 1) AZO + 50%N; 2) B1 + 50%N; 3) B2 + 50%N; 4) AZO+B1 + 50%N; 5) AZO+B2 + 50%N; 6) RI-com + 50% N; 7) RI-UFSC + 50%N. Em todos os tratamentos de inoculação simples e de coinoculação foi realizada a aplicação de N correspondente 50% da adubação nitrogenada recomendada em cobertura (50% N). Além destes tratamentos foram avaliados três tratamentos não inoculados: 8) 0% N, 9) 50% N e 10) 100% N, cuja a dose corresponde a redução na adubação de cobertura. Dessa forma o experimento foi composto por 10 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado e seis repetições totalizando 60 unidades experimentais.

Os inoculantes bacterianos foram obtidos a partir do crescimento dos isolados previamente em meio DYGS. Todos os isolados foram crescidos sob agitação constante (150 rpm) a 25°C, até uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. As quantidades de inoculantes aplicadas nos tratamentos de inoculação simples foram estimadas a modo de fornecer  $10^6$  UFC semente<sup>-1</sup>, enquanto nos tratamentos de coinoculação aplicou-se esta quantidade para cada um dos isolados. O inoculante *Rhizophagus intraradices* continha cerca de 2.500 propágulos por grama de produto, enquanto o inoculante RI-UFSC continha 40 esporos por grama de solo-inóculo. As quantidades aplicadas dos inoculantes micorrízicos foram definidas de modo de fornecer 25 e 20 propágulos por semente para RI-Com e RI-UFSC respectivamente. Para os tratamentos controles realizou-se a aplicação de água destilada esterilizada.

A adubação do solo foi realizada de forma simular as condições da cultura no campo. Inicialmente foram adicionados 150 mL de solução de Hoagland e Arnon (1995) com N para suprir a necessidade de nutrientes no plantio. Os tratamentos com aplicação de fertilizantes nitrogenados em cobertura receberam nitrato de amônio (34 % N) no estágio V3 da cultura. As doses de N aplicadas foram de 60 kg N ha<sup>-1</sup> e 30 kg N ha<sup>-1</sup> que corresponderam aplicação a 0, 428 g (100 % N) e 0,214 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (50% N) vaso<sup>-1</sup> da recomendação total de fertilizante nitrogenado respectivamente.

Estas quantidades foram estimadas considerando uma expectativa de produção de 8 ton ha<sup>-1</sup> (MANUAL DE CALAGEM E ADUBAÇÃO PARA OS ESTADOS DO RIO GRANDE

DO SUL E SANTA CATARINA, 2016). Os vasos foram irrigados periodicamente de modo a manter a capacidade de campo. O ensaio foi conduzido por 90 dias e as coletas foram realizadas aos 45 e 90 dias após a emergência das plantas (D.A.E.)

#### *4.3.1.2 Avaliações*

##### *4.3.1.2.1 Variáveis biométricas*

Para determinação da altura, as medidas foram realizadas desde a superfície do solo até a inserção da última folha formada. A avaliação do diâmetro do colmo foi realizada paquímetro digital 1,0 cm da base do caule. Ambas as avaliações foram realizadas 45 dias D.A.E. Aos 90 D.A.E determinou-se a produção de biomassas das plantas, em que amostras seca, raízes e parte aérea, foram separadas e secas em estufa com circulação forçada a 65 ° C até atingir peso constante.

##### *4.3.1.2.2 Teor de N e P foliar*

Os teores foliares de N e P foram determinados conforme metodologias descritas em Tedesco et al., (1995) a partir de amostras da parte aérea do milho coletadas aos 90 D.A.E. Os tecidos foliares foram submetidos a secagem e processados em moinho tipo Willey. A determinação de N foi realizada pelo método semi-micro Kjeldahl e P por espectrofotometria.

##### *4.3.1.2.3 Teor de clorofila e carotenoides*

Para determinação do teor de clorofila e carotenoides empregou-se metodologia proposta Lichtenthaler e Wellburn (1993) em foram coletados cinco discos foliares com 5 mm de diâmetro de cada amostra perfazendo 0,98 cm<sup>2</sup> de área foliar. Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e mantida em banho maria a 65 ° C, durante uma hora (LONDONÕ, D.M.M, 2016; SANTOS et al., 2008). Após esse período o sobrenadante foi filtrado e realizou-se a leitura em espectrofotômetro. A

quantificação da densidade ótica foi realizada a 649 nm (Clorofila A), 665 nm (Clorofila B) e 470 nm (Carotenoides). Para estimar estes componentes fotossintéticos forma empregadas as fórmulas propostas por Lichtenthaler e Wellburn (1993), sendo os dados expressos em  $\mu\text{g cm}^{-2}$ :

$$\text{Clorofila A} = [12,19 \times (A_{665}) - 3,45 \times (A_{649})];$$

$$\text{Clorofila B} = [21,99 \times (A_{649}) - 5,32 \times (A_{665})];$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila A} + \text{Clorofila B};$$

$$\text{Carotenoides} = [1000 \times (A_{470}) - 2,14 \times (\text{Clorofila A}) - 70,16 \times (\text{Clorofila B})]/220.$$

#### 4.4 ENSAIO II

##### 4.4.1 Local de implantação e instalação do experimento

Para avaliação da eficiência agrônômica e nutricional de MPCP, foi conduzido um ensaio em uma área produtora da cultura, localizada no município de Jaborá-SC (27°07'56.73" S 51°43'11.77" O) no período de 14/11/2021 a 18/04/2022. O solo, classificado como Cambissolo Háptico Ta Eutrófico, teve sua caracterização química (Tabela 3) realizada pelo Laboratório de solos da Universidade do Oeste do Estado de Santa Catarina (UNOESC), de acordo com as metodologias propostas pela COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO-RS/SC (2004).

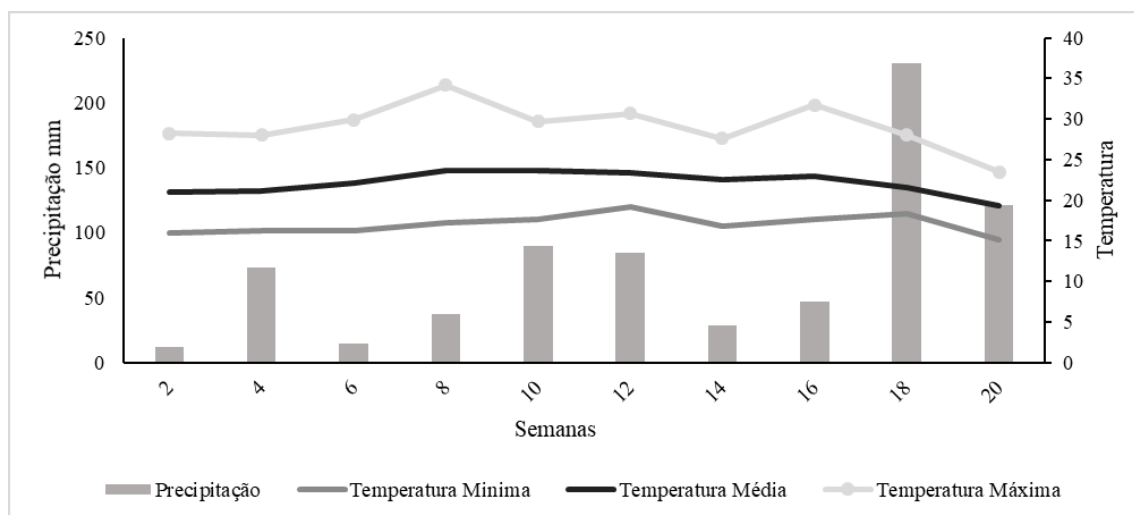
Tabela 2: Caracterização química e teor de argila do solo da área de condução do Ensaio II.

<b>P</b>	<b>K</b>	<b>MO</b>	<b>pH</b>	<b>Índice</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
<b>mg dm<sup>-3</sup></b>		<b>%</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sup>3</sup></b>	<b>SMP<sup>3</sup></b>		<b>cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup></b>
70,26 (Muito alto)	511,14 (Muito alto)	4,8 (Média)	5,71	5,89	8,62	2,60
<b>H+Al</b>	<b>CTC pH 7,0</b>	<b>% da saturação da CTC pH 7</b>		<b>Argila</b>		
<b>cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup></b>		<b>Base (V%)</b>		<b>%</b>		
4,94	17,48	71,7		44 (classe 2)		

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A área selecionada para realização do experimento tem como histórico o plantio do milho na safra de verão, sendo mantida em pousio durante o período de inverno. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa subtropical com verão quente, temperatura média acima de 22° C. Os dados de precipitação e temperatura durante a condução do experimento safra 2021/2022 são apresentados na Figura 1.

Figura 1 : Precipitação, temperatura mínima, média e máxima, durante a condução do ensaio a campo para avaliação da inoculação simples e coinoculação de MPCP na cultura do milho.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho, a partir de dados obtidos na estação meteorológico do IMET na cidade de Joaçaba/SC localizada a 40 km da área do ensaio.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com seis repetições, utilizando-se a mesma variedade de milho e os mesmos tratamentos descrito no Ensaio I. Os inóculos bacterianos foram preparados conforme descrição apresentadas no item 4.3.1.1 e a inoculação nas sementes foi realizada de modo de fornecer  $10^9$  UFC semente<sup>-1</sup>. Os tratamentos de inoculação com FMA foram obtidos seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.1.1. Para o tratamento RI-Com foi utilizado produto comercial Rootella BR o qual continha 2,500 propágulos g produto<sup>-1</sup>. Este produto foi aplicado seguindo recomendação do fabricante de 120 g produto ha<sup>-1</sup>. Quantidade esta que permitiu a fornecimento de 25 propágulos de FMA por semente. Para o tratamento RI-UFSC foi

adicionada 60 g e um solo inóculo contendo 40 esporos  $\text{g}^{-1}$  solo inoculo, esta quantidade permitiu a aplicação de 20 esporos de *R. intraradices* por semente de milho. Para melhorar a aderência dos propágulos de FMA nas sementes foi adicionado 25 ml de goma xantana 1 % (m/v) em 2,5 kg de sementes de milho a serem tratadas.

A semeadura foi realizada utilizando-se uma semeadora mecânica de quatro linhas, distribuindo cinco sementes por metro linear. Cada parcela experimental foi constituída de quatro linhas com 0,6 m de espaçamento com 10 m de comprimento e 2,4 metros de largura, totalizando 24  $\text{m}^2$  e com bordadura de 5 metros entre parcelas. Os dados foram coletados considerando as duas linhas centrais das parcelas, excluindo-se um metro das extremidades. Em todos os tratamentos foi realizada a adubação base na semeadura, na dosagem de 243  $\text{kg ha}^{-1}$  do formulado NPK 9-21-13, de modo a fornecer 22  $\text{kg ha}^{-1}$  N, 51  $\text{kg ha}^{-1}$  P e 31  $\text{kg ha}^{-1}$  K. Adubação de plantio foi determinada conforme o Manual de Calagem e Adubação para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ROLAS, 2016) com expectativa de produtividade de 8.000  $\text{kg ha}^{-1}$ .

Os tratamentos de adubação nitrogenada formam constituídos pela aplicação de 0, 19 e 38  $\text{kg ha}^{-1}$  N na forma de ureia em cobertura aos 40 D.A.E, quando a cultura se encontrava no estágio V5. As doses de N supracitadas correspondem ao tratamento 0% N, 50% N e 100% N, respectivamente. Para o controle de plantas espontâneas foi realizada a aplicação do herbicida Glifosato no estágio V6.

#### **4.4.2 Avaliações**

##### *4.4.2.1 Teor foliar de N e P*

A coleta para avaliação do teor de N e P foi realizada no estágio vegetativo VT (pendoamento), sendo coletada a primeira folha oposta abaixo da primeira espiga de sete plantas dentro da área útil de cada parcela. Em seguida, as amostras foram armazenadas em embalagem de papel e colocadas para secagem em estufa a 65°C até atingirem peso constante. Para a determinação do teor de N e P foram utilizados os mesmos métodos citados no Ensaio I.

#### 4.4.2.2 Biomassa e Rendimento.

No estágio reprodutivo R6 de desenvolvimento da cultura foram determinados produção biomassa e o rendimento de grãos. Inicialmente, foram coletadas 20 plantas na área útil de cada parcela e determinou-se a massa fresca. Uma subamostra foi submetida à secagem em estufa a 65° C com circulação de ar forçado até atingir peso constante e estimada a produção de biomassa por cada parcela, sendo os dados expressos em kg ha<sup>-1</sup>. As espigas das plantas coletadas foram debulhadas em uma trilhadora mecânica para a determinação do rendimento de grãos a 13% de umidade, sendo os resultados expressos em kg ha<sup>-1</sup>.

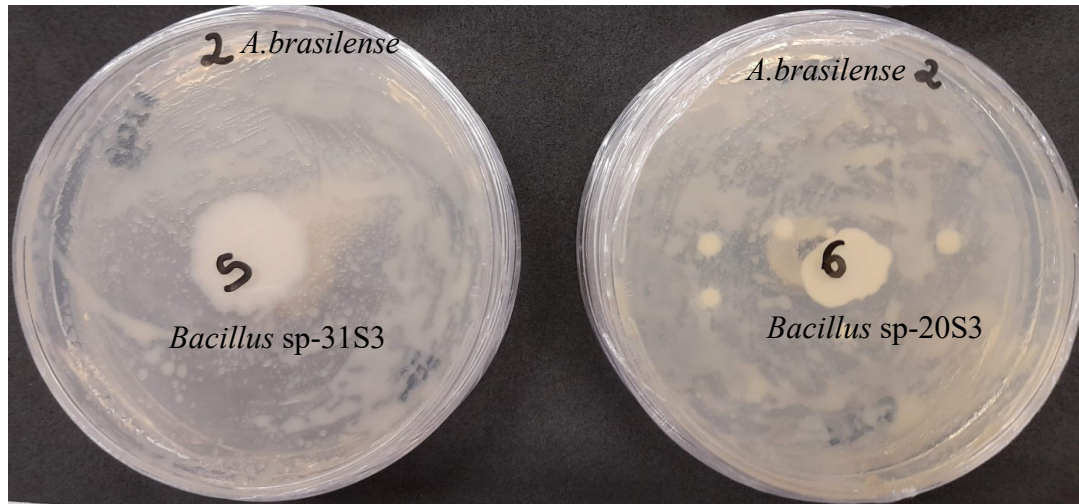
## 5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis avaliadas foram submetidas a teste de homocedasticidade pelo teste de Bartlett 5 % de significância. Em seguida submetidas, os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Quando os tratamentos foram significativos as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5 % de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA,2011).

## 6 RESULTADOS

O teste de compatibilidade mostrou que não houve inibição do crescimento das estirpes (formação de halo de inibição) entre as combinações avaliadas (Figura 2). Esses resultados evidenciam ausência de antagonismo entre as estirpes confrontadas, o que viabilizou a avaliação dos tratamentos de coinoculação no milho, conforme ensaios descritos a seguir.

Figura 2: Ensaio de compatibilidade entre os isolados *A. brasilense*-AbV6 vs. *Bacillus* sp- 31S3 e *A. brasilense* vs. *Bacillus* sp- 20S3 (6) por meio da confrontação direta em meio de cultura sólida Ágar Nutriente por 48 horas a 25°C.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho

## 6.1 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

### 6.1.1 Variáveis biométricas

Os efeitos da inoculação simples e da coinoculação nas variáveis biométricas são apresentadas na Tabela 3. A altura das plantas variou de 56,3 a 67,6 cm, enquanto no diâmetro a média variou de 0,30 a 0,41 mm. A produção de MSR variou de 0,35 a 0,54 g/planta. Já a produção de MSPA variou de 1,42 a 2,48 g/planta. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto a essas variáveis.

Tabela 3: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasillense* (AZO), *Bacillus* ssp (B1 e B2) *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) na altura de plantas, diâmetro de colmo, na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) do milho (*Zea mays*) em solo não estéril em condições de casa de vegetação (n=6).

TRATAMENTOS	Altura cm	Diâmetro mm	MSR g planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
0% N	56 a	0,35 a	0,39 a	1,77 a
50% N	68 a	0,35 a	0,48 a	1,96 a
100% N	65 a	0,36 a	0,49 a	2,3 a
AZO	65 a	0,38 a	0,51 a	2,32 a
B1	61 a	0,41 a	0,19 a	2,22 a
B2	56 a	0,31 a	0,53 a	1,92 a
AZO + B1	62 a	0,30 a	0,42 a	2,02 a
AZO + B2	59 a	0,33 a	0,58 a	2,14 a
RI-UFSC	63 a	0,40 a	0,64 a	3,15 a
RI-Com	62 a	0,36 a	0,4 a	2,24 a

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de separação de médias SNK ( $p < 0,05\%$ ).

### 6.1.2 Teor e acúmulo de N, P, teor de clorofila e carotenoides

Os efeitos da inoculação dos microrganismos no teor e acúmulo P do milho podem ser verificados na Tabela 4. O teor de P variou de 526 a 548 g kg<sup>-1</sup>. Já o acúmulo de P variou de 0,76 a 1,68 mg planta<sup>-1</sup>. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à estas variáveis. Em contrapartida, verificou-se que as plantas inoculadas com RI-UFSC apresentaram decréscimo de 35% no teor de N em relação à média dos demais tratamentos (Tabela 4). Já o acúmulo de N variou de 48 a 78 mg planta<sup>-1</sup>, porém sem apresentar diferenças significativas entre os tratamentos. Em relação os parâmetros fotossintéticos avaliados verificaram-se que os teores de clorofila total e de carotenoides não foram influenciados pelos tratamentos de inoculação (Tabela 4).



Tabela 4: Efeito da inoculação e coinoculação de *A.brasillense* (AZO), *Bacillus* spp (B1 e B2) *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) teor, acúmulo de fósforo (P) e nitrogênio (N), nos teores de clorofila e carotenoides.

TRATAMENTOS	Teor de N g kg <sup>-1</sup>	Teor de P g kg <sup>-1</sup>	Acúmulo N mg planta <sup>-1</sup>	Acúm P mg planta <sup>-1</sup>	Clofilla Total (µg cm <sup>-2</sup> )	Carotenóides (µg cm <sup>-2</sup> )
0% N	32,73 a	549 a	48,06 a	0,91 a	20,5 a	3,8 a
50% N	33,30 a	528 a	65 a	1,03 a	21,2a	3,7 a
100% N	28,6 a	696 a	57,15 a	1,62 a	21 a	3,5 a
AZO	32,06 a	657 a	74,11 a	1,57 a	21 a	3,4 a
B1	30,5 a	668 a	57,30 a	1,45 a	18,3 a	3,1 a
B2	37,6 a	527 a	53,75 a	1,01 a	21 a	3,0 a
AZO + B1	32,55 a	679 a	66 a	1,42 a	25 a	4,0 a
AZO + B2	33,53 a	601 a	72,08 a	1,30 a	22 a	3,4 a
RI-UFSC	21,13 b	668 a	56 a	1,67 a	23 a	4,0 a
RI-Com	33,60 a	618 a	72 a	1,40 a	23 a	3,6 a

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de separação de médias SNK ( $p < 0,05\%$ ).

## 6.2 ENSAIO A CAMPO

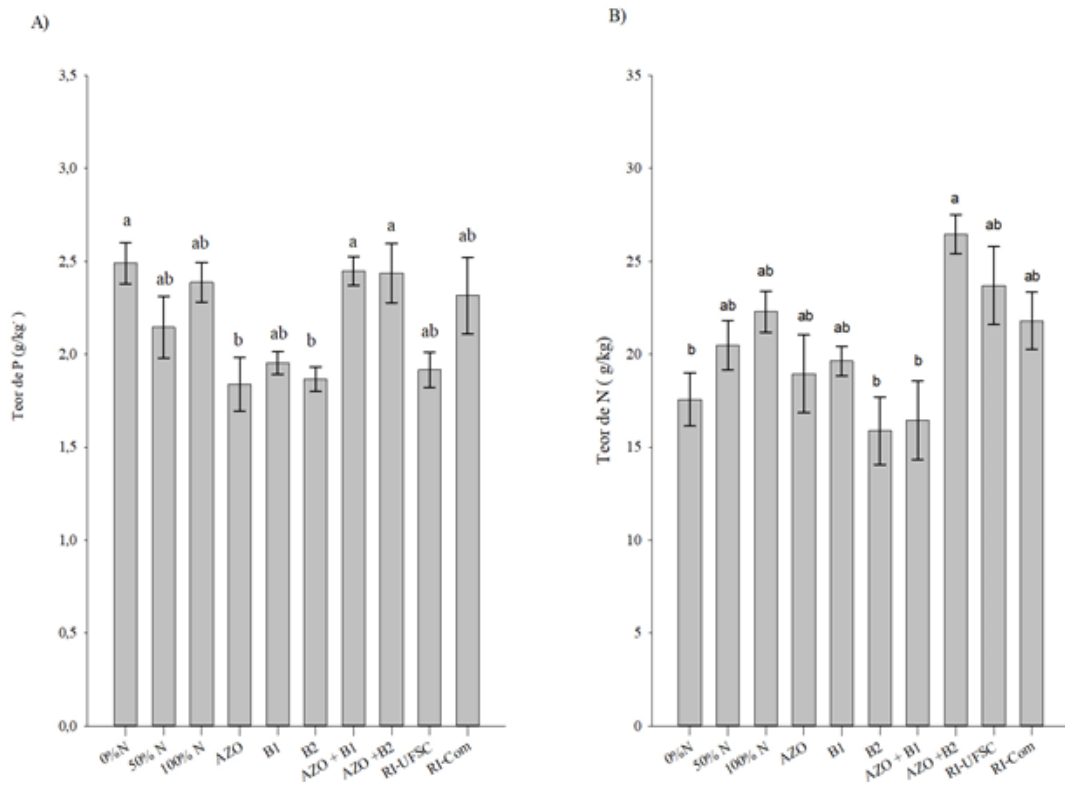
### 6.2.1 Teor Foliar (P e N)

O teor de P foliar foi significativamente influenciado pelos tratamentos de inoculação (Figura 3), com valores variando de 1,83 a 2,49 g kg<sup>-1</sup>. Os tratamentos de coinoculação (AZO + B1 e AZO+B2) e o tratamento controle (0% N) apresentaram teores de P superiores aos tratamentos de inoculação simples AZO e B2, com um incremento médio de 25%. Adicionalmente, verificou-se que os tratamentos micorrizados não diferiram dos tratamentos controles e daqueles inoculados com as bactérias associativas.

Assim como observado para o teor de P, verificou-se que os tratamentos de inoculação com bactérias associativas também influenciaram os teores foliares de N no estágio vegetativo (Figura 3-B), com valores variando de 16 a 25 g kg<sup>-1</sup>. Verificou-se que apenas o tratamento de

coinoculação AZO+ B2 diferiu do tratamento controle de 0% N quanto aos teores de N, com incremento médio da ordem de 37%.

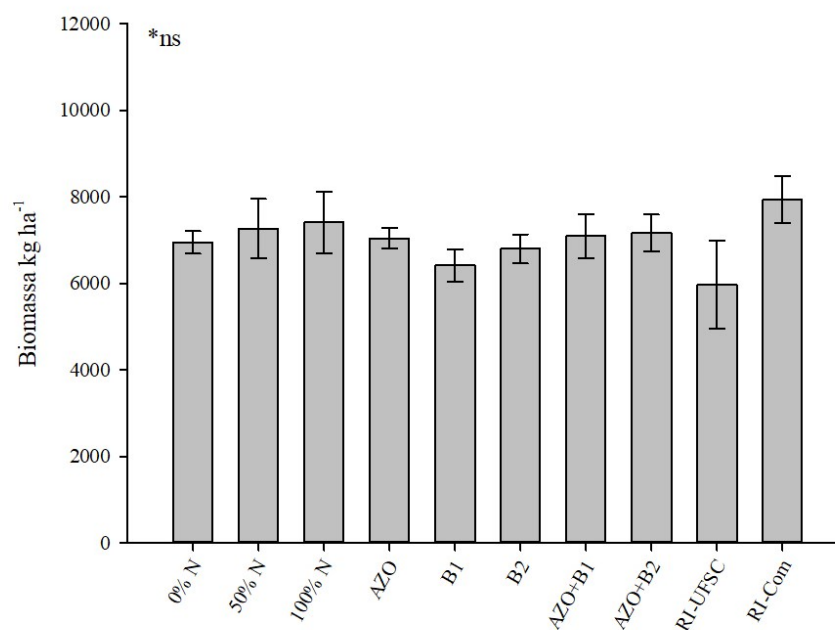
Figura 3: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* spp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) (A) no teor de nitrogênio (N) (n=7) e (B) fósforo foliar (P) (n=7) no milho (*Zea mays*) condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ). \*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média.



### 6.2.1 Produção de biomassa

No final da condução do ensaio a campo, verificou-se que produção de biomassa variou de 6.415 kg ha<sup>-1</sup> a 7.941 kg ha<sup>-1</sup> (Figura 4), porém não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação a essa variável.

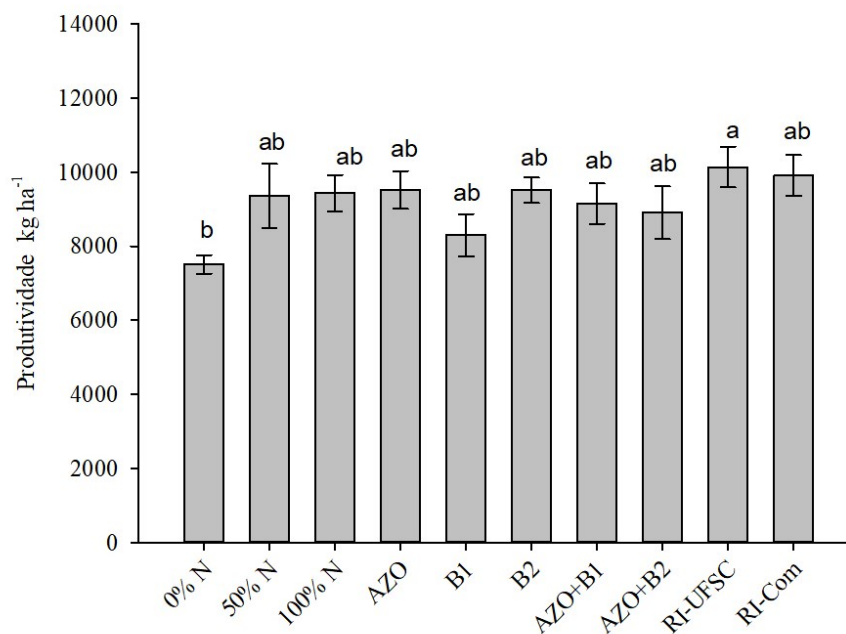
Figura 4: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* spp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) na produção de biomassa cultura do milho. \*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média.



### 6.2.2 Rendimento de grãos

A inoculação dos microrganismos influenciou o rendimento de grãos (RG) do milho como pode ser verificado na Figura 5, com valores variando de 7.508 a 10.134 kg ha<sup>-1</sup>. O tratamento micorrizado RI-UFSC aumentou 26% em relação ao tratamento controle 0% N (não inoculado e sem aplicação de N). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças significativas entre os demais tratamentos para esta variável.

Figura 5: Efeito da inoculação e coinoculação de *A. brasilense* (AZO), *Bacillus* spp (B1 e B2) e *Rhizophagus intraradices* (RI-UFSC e RI-Com) no rendimento de grãos de milho (*Zea mays*) em solo não estéril em condições de campo. As médias seguidas pela mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ). \*ns: Diferenças não significativas pelo F-test ( $p < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média.



## 7 DISCUSSÃO

A aplicação de inoculantes é uma prática em crescente adoção na agricultura mundial, visando tornar os ambientes de produção cada vez mais sustentáveis. Entretanto, a busca pela manutenção de altas produtividades e baixo impacto ambiental faz com que se busque recursos genéticos cada vez mais eficientes para compor estes insumos biológicos. Adicionalmente, espere-se que efeitos aditivos possam ser verificados com a utilização de microrganismos com distintas capacidade de promoção de crescimento vegetal. Neste sentido, efeitos promissores podem ser obtidos com a utilização de consórcios microbianos. Para avaliar o potencial biotecnológico destes consórcios, é necessário identificar a sinergia entre as estirpes envolvidas. Neste sentido a realização do presente estudo se faz relevante, uma vez que foi verificado que as bactérias associativas objeto de estudo no presente trabalho (*A. brasilense* e *Bacillus* spp) não produziram substâncias inibitórias que comprometessem o crescimento microbiano. Dessa forma podemos afirmar que as estirpes são compatíveis para a composição de consórcios microbianos. Este resultado permitiu que os isolados em questão fossem utilizados nos ensaios posteriores para avaliação dos efeitos da coinoculação sobre o crescimento e nutrição mineral do milho. Ribeiro et al, (2022) também ao realizar a confrontação direta de estirpes do gênero *Bacillus* e *Azospirillum* verificou a compatibilidade entre as mesmas, evidenciando que estes gêneros podem compor consórcios microbianos.

Os efeitos positivos da inoculação de MPCP se revela pelo maior acúmulo de biomassa ou nutrientes como o N e o P na planta. No ensaio em casa de vegetação a inoculação simples ou dupla não proporcionaram efeitos significativos para as variáveis biométricas (altura, diâmetro, produção de biomassa aérea e radicular), teor de clorofila total, teor de N e P e no acúmulo dos mesmos. Também trabalhando em condições de casa de vegetação, Moraes et al., (2017) não verificaram efeitos significativos na altura, diâmetro do colmo e teor clorofila em plantas de milho inoculados com *A. brasilense*. Resultados não significativos decorrentes na inoculação com MPCV também foram relatados por diversos pesquisadores. (HOEKSEMA et al., 2010; SPOLAOR et al., 2016; MORENO, A.L; KUSDRA, J.F; PICAZAÉVICZ, A.A.C, 2019; DICKAMANN et al., 2022.)

A resposta a interação com MPCP é definida como o incremento no crescimento e absorção de nutrientes como o P e N por parte das plantas (JANOS. 2007). O efeito dessa interação pode ser definido como positivos, negativos ou neutros. Efeitos positivos da inoculação são caracterizados pelo maior acúmulo de biomassa ou N e P das plantas quando inoculadas com estes microrganismos. Efeitos negativos são observados quando há uma menor biomassa ou acúmulo de nutriente recorrente da inoculação, isso deve-se principalmente quando a situação do estado não mutualístico não beneficia a planta hospedeira, apresentando-se como um gasto de energia para a mesma. Este comportamento foi verificado por Morales Londoño (2016) em plantas de milho inoculadas com FMA em condições controladas apresentaram um decréscimo na altura de planta e diâmetro de colmo em relação ao tratamento não inoculado.

Enquanto os benefícios neutros são aqueles onde existe uma relação equivalente em crescimento e acúmulo de nutrientes entre plantas inoculadas e aquelas que não receberam inoculo. Esse comportamento foi observado no presente trabalho, cuja inoculação com MPCP apresentou efeito neutro no teor de clorofila das plantas de milho. Esse comportamento pode sido determinado pela época de condução do Ensaio I (casa de vegetação). Na região sul do Brasil, entre os meses de julho a setembro ocorre maior queda na temperatura noturna, assim como fotoperíodo. Como o desenvolvimento do milho é altamente dependente das temperaturas do ar, sendo que esta determina a velocidade de crescimento e marca as fases fenológicas da cultura (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014), os dias mais frios causam menor desenvolvimento foliar, afetando a atividade fotossintética. Adicionalmente as características químicas do solo podem afetar o estabelecimento e a resposta das interações planta-microrganismos.

Os efeitos neutros da inoculação com MPCP também foram verificados sobre as variáveis biométricas e de absorção de nutrientes, isto pode estar associado aos altos teores de matéria orgânica do solo (MOS) (Tabela 1). Solos com MOS acima de 3 % apresentam alta fertilidade, como aumento na retenção de nutrientes e sua disponibilidade, especialmente o nitrogênio como descrito por Araújo; Tadeu; Martins (2016). GEHIL (2017) conduziu ensaio em solo características químicas semelhantes ao do presente estudo e verificou que a inoculação com *A. brasilense* também apresentou efeitos neutros no teor de N e P na cultura do milho. Situações em que as plantas são submetidas a altas doses de N, as bactérias fixadoras de N

interrompem a síntese do complexo nitrogenase e as plantas passam utilizar o N disponível do solo. Os efeitos não significativos para o teor de clorofila total corroboram os resultados verificados quanto ao teor de N nas folhas, uma vez que o teor deste pigmento possui correlação positivas com o teor de N na planta (SILVA et al., 2022).

Por outro lado, em condições de campo (Ensaio II) verificou-se efeito significativo da inoculação da inoculação simples e coinoculação nos teores nutricionais do milho. Os fatores que podem ter contribuído para estes resultados estão relacionados com o estágio fenológico da planta e a época de amostragem para a avaliação do estado nutricional. Para análise química dos teores de nutrientes em tecido vegetal é indicado que a amostragem seja realizada quando a cultura esteja em pleno crescimento vegetativo. Para cultura do milho, mais especificamente, é indicado que a amostragem seja realizada quando 50 % das plantas estejam pendoadas e com estigmas maduros. Isso corresponde ao estágio vegetativo VT (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO–RS/SC, 2016). Esta foi a fase na qual foi realizada a amostragem para determinação do estado nutricional das plantas de milho em condições de campo.

Na fase VT a cultura do milho apresenta máxima absorção de fósforo e nitrogênio, refletindo assim no aumento do teor destes nutrientes no tecido vegetal. De acordo com Marscher, H (2012) o teor adequado de P para o crescimento é de  $2,0 \text{ g kg}^{-1}$  e de  $15 \text{ g kg}^{-1}$  de N. A concentração de N e P encontrada neste trabalho evidenciam o adequado estado nutricional das plantas de milho do ensaio a campo, uma vez que o teor médio de N e P foram de 20 e  $2 \text{ g kg}^{-1}$  respectivamente. Merece destaque os benefícios da AZO+B2 sobre a absorção de P e N em relação à inoculação simples (B2). Do ponto de vista nutricional este tratamento de coinoculação proporcionou teor adequado de P e N em relação a inoculação simples (B2), a qual apresentou teor inferior a faixa indicada de P e valores próximos da faixa limite de N. Os efeitos positivos deste consórcio podem ter relação com a capacidade de fixação biológica de  $\text{N}_2$  das bactérias do gênero *Azospirillum* aliado à capacidade de solubilização de fosfatos pelo gênero *Bacillus* (HUNGRIA et al, 2010, PAIVA et al., 2020). De acordo com Ribeiro et al., 2022 as coinoculações com *Bacillus* + *Azospirillum*, influenciaram positivamente no aumento no teor de P e N da parte aérea.

De acordo com SANTOYO, (2021) a coinoculação pode complementar a ação individual de cada um dos isolados, proporcionando incremento de nutriente. Em um estudo conduzido por Gómez-Godínez et al., (2019) a aplicação de um inóculo com multiespécies de

BPCP teve efeito superior no incremento de N inoculo nas plantas de milho, em relação a aplicação de *Azospirillum*. Os mesmos autores levantaram a hipótese que a formação de biofilme induzida por exsudatos radiculares e por agregados formados por *Bacillus* e *Azospirillum*, podem fornecer uma condição mais favorável a fixação de N, devido à maior proteção ao oxigênio.

As respostas mais positivas da inoculação com MPCP são obtidas em condições mais limitantes de crescimento para as plantas. Assim como no ensaio conduzido em casa de vegetação, o solo da área experimental utilizada possui alto teor de MO e P. Esta condição pode influenciar o estabelecimento das associações simbióticas, conforme discutido anteriormente, bem como na máxima expressão dos benefícios da interação entre BPCP e plantas.

Geralmente a simbiose com FMA beneficia a absorção de nutrientes pelas plantas, sendo que o aumento na absorção de P é a principal característica da simbiose planta-FMA. Entretanto, apesar de ter sido verificado aumento no rendimento do milho, não foi observado benefício na absorção de P nas plantas inoculadas com RI-UFSC. Isso evidencia que ação dos FMA não fica restrita ao efeito nutricional e vários mecanismos de redução de estresse bióticos e abióticos são relatados na literatura (REINHARDT, 2007, SINGH et al., 2019 WU et al., 2020). Vale destacar que ausência de efeitos inoculação com FMA, sobre a absorção de P pode estar relacionada com a alta fertilidade do solo, empregada no presente estudo. Nesta condição, a alta disponibilidade de P reduz a contribuição extra da simbiose na absorção deste nutriente. Estas respostas corroboram com estudos conduzidos em casa de vegetação por (2021) em que não foi verificado efeito positivo com *R. intraradices* no incremento dos teores de N e P em plantas de milho. Estudos a campo conduzidos em cinco regiões edafoclimáticas demonstraram que a inoculação com *R.intraradices* não aumentou a absorção de P pelo milho em condições de alta disponibilidade de P no solo. (STOFFEL et al., 2020).

De modo geral, inoculação com MPCP do presente trabalho proporcionou rendimento de grãos médio de 9,318 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto os tratamentos controles 0% N, 50% N e 100 % N em 7.505, 9.353 e 9. 430 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente. Embora os benefícios das associações micorrízicas estejam associados com o aumento da aquisição de elementos pouco móveis no solo, como é o caso do P, estudos têm demonstrado que os FMA podem também contribuir para a absorção de N (GOVINDARAJULU, et al., 2005). No presente estudo merece de destaque a inoculação com RI-UFSC que proporcionou aumento significativo de 44 sacas por hectare em



relação ao tratamento controle 0%N. Embora não tenha sido verificada diferença significativa entre os tratamentos RI-UFSC e o controle 50% N, a inoculação com FMA pode contribuir para o rendimento das culturas em situações limitantes ao desenvolvimento vegetal ao longo do ciclo das culturas. A resposta positiva da inoculação micorrízica com R.I-UFSC pode estar relacionada com sua rede de micélios extra radicular, a qual permite explorar um maior volume de solo, aumentando a eficiência de absorção e disponibilização de água e nutrientes ao ultrapassar a zona de depleção, contribuindo para que as plantas possam suportar situações adversas como estresse abióticos ou bióticos (SMITH; READ, 2008).

De fato, estudos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a aplicação do inoculante micorrízico comercial a base de *R. intraradices* aumenta a produtividade de culturas de importância agrícola como a soja e o milho (STOFFEL et al, 2020a; STOFFEL et al, 2020b). Nestes estudos verificou-se que a inoculação de sementes com *R. intraradices* aumentou em 30% o rendimento na cultura do milho sem aplicação de P, sendo a produtividade semelhante àquela obtida com a adubação fosfatada completa (STOFFEL et al., 2020 b). No entanto, para as condições avaliadas no presente estudo, este mesmo produto comercial não apresentou efeito significativo na absorção de P e rendimento de grãos. Como discutido anteriormente, isso pode estar relacionado com a alta disponibilidade de MOS e P no solo que podem afetar o estabelecimento da associação, reduzindo a expressividade dos efeitos da inoculação.

De acordo com Moreira e Siqueira (2006) os efeitos da inoculação são mais evidentes em condições edafoclimáticas limitantes para o crescimento vegetal, dado ao caráter biofertilizador, biorregulador e biocontrolador dos MPCP. Cada situação de plantio e as particularidades do ambiente vão proporcionar estímulos tanto sobre as plantas quanto para os microrganismos, podendo beneficiar ou não o crescimento vegetal. Dessa forma, conhecer a biologia dessas interações em diferentes situações, assim como estudo com novas combinações de microrganismos são importantes para futuras recomendações de coinoculação de MPCP, a modo de certificar a eficiência e necessidades destes produtos na agricultura.

## 8 CONCLUSÕES

As bactérias associativas *A. brasilense* e *Bacillus* spp testadas, não apresentaram incompatibilidade, podendo ser compatíveis para composição de consórcios microbianos.

A fertilidade do solo e a época de condução do ensaio em casa de vegetação podem ter resultado ausência de efeitos da inoculação de *A. brasilense* e *Bacillus* spp (isoladamente ou em coinoculação) e de FMA sobre as variáveis biométricas nutricionais e atributos fotossintéticos na cultura do milho.

Em condições de campo o fungo micorrízico RI-UFSC, demonstrou potencial de aumentar o rendimento da cultura do milho nas condições avaliadas.

## 9 REFERÊNCIAS

ADESEMOYE, AO; TORBERT, HA; KLOEPPER, JW As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas permitem taxas reduzidas de aplicação de fertilizantes químicos. **Ecologia microbiana**, v. 58, p. 921-929, 2009.

ALLEN, M.F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. **Mycological Research**, v. 7, p. 769-782, 1992.

ANDRADE, ALEX CARVALHO et al. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1643-1651, 2003.

ARAÚJO, Érica de Oliveira; TADEU VITORINO, Antonio Carlos; MARTINS MERCANTE, Fábio. Doses de nitrogênio e inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho em condições de solo fértil. **Acta Agronômica**, v. 65, n. 1, p. 16-23, 2016.

ARAÚJO, Fábio Fernando de; HUNGRIA, Mariângela. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.34, p. 1633–1643, 1999.

ARDAKANI, M. R. et al., Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p.181–192, 2011.

BABALOLA, Olubukula Oluranti. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1559-1570, 2010.

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, p. 183-196, 2018.

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, p. 183-196, 2018.

BALBINOT, Guilherme Gilberto; RODRIGUES, Sabrina; REGINA BOTELHO, Glória. Isolados de *Bacillus* sp. do alho: efeito no desenvolvimento do milho e nos mecanismos de promoção do crescimento da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, 2020.

BÁRBARO, I.M. BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. da. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade, 2008.

BARBOSA, Julierme Zimmer et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: EMATER/RSAscar, 2014.

BISSANI, C. A. et al. Nitrogênio e Adubos nitrogenados. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**, v. 2, p. 145-168.

BRACCINI A.L et al. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Sci Agrar Paran.** v.15, p. 27-35. 2016.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa SDA nº 13, de 24 de março de 2011. Altera a Instrução Normativa SARC nº 05, de 6 de agosto de 2004. Diário Oficial da União:

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário Mineral. Coord. Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves Brasília, 2016.

BRATTACHARYYA, Pranab N; JHA, Dhuruva K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

CAMPOS, Daniela Tiago da Silva; ANDRADE, João Antônio da Costa; CASSIOLATO, Ana Maria Rodrigues. Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. **Bragantia**, v. 69, p. 555-562, 2010.

CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira et al. PGPR in coniferous trees. **Bacteria in agrobiology: crop ecosystems**, p. 345-359, 2011.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. Piracicaba: Potafos, 1995. **Arquivo do agrônomo**, v. 8, p. 1-9.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Distrito Federal, v.9 safra 2021/22.

CONAB. Série histórica das safras. Brasília, DF: Conab; 2020.

CORRÊA, Juliano Corulli et al. Disponibilidade de metais pesados em Latossolo com aplicação superficial de escória, lama cal, lodos de esgoto e calcário. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 411-419, 2008.

COSTA, Elaine et al. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia biosfera**, v.10, n.19; p. 2014.

DARTORA, Janaína et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1023-1029, 2013.

DE PESQUISA AGROPECUÁRIO, Empresa. Síntese Anual de Agricultura de Santa Catarina. Florianópolis: **Epagri/Cepea**, 2021.

DE SOUSA, Sylvia Morais et al. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 2, p. 867-877, 2021.

DICKMANN, Lourdes et al. Residual da adubação fosfatada e efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho verão consorciado com gramínea em região de cerrado. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e9111326134-e9111326134, 2022.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. Biologia dos solos dos cerrados. Planaltina, Embrapa-cpac, p. 17–66, 1997.

FERREIRA, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, V. 35, N. 6, P. 1039–1042.

FOSS, E.L. Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê. In.: 3.ed. Passo fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. p.751.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v.6, p.1-13, 2016.

GHYSELINCK, Jonas et al. Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 116-127, 2013.

GIEHL, Jeferson. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em híbridos comerciais de milho. 2017.

GÓMEZ-GODÍNEZ, Lorena Jacqueline et al. Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs. **Systematic and applied microbiology**, v. 42, n. 4, p. 517-525, 2019.

GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the actinomycetales. In: **Society for Applied Bacteriology symposium series**. 1973. p. 1-10.

GOVINDARAJULU, et al. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 819-823, 2005

GRANT, C. A. et al. Crop yield and nitrogen concentration with controlled release urea and split applications of nitrogen as compared to non-coated urea applied at seeding. **Field Crops Research**, v. 127, p. 170-180, 2012.

GUO, Wei et al. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the development of maize (*Zea mays* L.) grown in three types of coal mine spoils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 3592-3603, 2014.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 2, p. 433, 1984.

HAYAT, Rifat e cols. Bactérias benéficas do solo e seu papel na promoção do crescimento vegetal: uma revisão. **Annals of microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.

HAYMAN, D. S. B. Endomycorrhizae. In: **Developments in agricultural and managed forest ecology**. Elsevier, 1978. p. 401-442.

HIREL, B et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant physiology**, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, 2001.

HOEKSEMA, Jason D. et al. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. **Ecology letters**, v. 13, n. 3, p. 394-407, 2010.

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

HUNGRIA, Mariangela et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331 p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

ICHIWAKI, S. **Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e acúmulo de proteico em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

IFA. INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION (2020). Disponível em: <[https://www.fertilizer.org/en/statistics/market\\_outlooks/en/statistics/market\\_outlooks.aspx?hkey=0ea97e25-6cd1-4fd9-9e0c-1ec733bce700](https://www.fertilizer.org/en/statistics/market_outlooks/en/statistics/market_outlooks.aspx?hkey=0ea97e25-6cd1-4fd9-9e0c-1ec733bce700)>. Acesso em 14 nov 2022.

JALONEN, R.; TIMONEN, S.; SIERRA, J.; NYGREN, P. Arbuscular mycorrhizal symbioses in a cut-and-carry forage production system of legume tree *Gliricidia sepium* and fodder grass *Dichanthium aristatum*. **Agroforestry Systems**, v. 87, p. 319-330, 2013.

JOUNG, K.-B.; CÔTÉ, J.-C. Avaliação de padrões de restrição de genes de RNA ribossômico para a classificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, pág. 97-108, 2002.

- KLEIN, Claudia; AGNE, Sandra Aparecida Antonini. Fósforo: de nutriente à poluente!. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, p. 1713-1721, 2012.
- LICHTENTHALER, Hartmut K.; WELLBURN, Alan R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 1983.
- LOBO, Laiana Lana Bentes. Potencial de bactérias endofíticas na promoção do crescimento em plantas de milho. 2018.
- MACHADO, H. B. et al. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37 (7), p. 549-553, 1991.
- MACHADO, V. J.; SOUZA, C. H. E. Disponibilidade de fósforo em solos com diferentes texturas após aplicação de doses crescentes de fosfato monoamônico de liberação lenta.
- MALUSÀ, A.; PINZARI, E.; CANFORA, F. Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. In: SINGH, D.; SINGH, H.; PRABHA, R. (Ed.). Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. New Delhi: Springer, 2016. v. 2, p. 17-40.
- MANDIC-MULEC, Ines; STEFANIC, Polonca; VAN ELSAS, Jan Dirk. Ecology of bacillaceae. **The bacterial spore: From molecules to systems**, p. 59-85, 2016.
- MARAG, Premsing Shivsing; SUMAN, Archana; GOND, Shrikant. Prospecting endophytic bacterial colonization and their potential plant growth promoting attributes in hybrid maize (*Zea mays* L.). **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 7, p. 1292-1304, 2018.
- MARSCHNER, Horst (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2011.
- MIRANDA, J. C. C. **Cerrado: micorriza arbuscular: ocorrência e manejo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.
- MOLINA-ROMERO, Dalia et al. Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds. **Protoc PLoS One**. 2017b, v. 12, n. 11, p. 1-2, 2017.
- MONTEIRO, R. A. et al. 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**, v. 80, n. 2, p. 441-451, 2012.
- MORAES, G. P. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 38, n. 3, p. 109-116, 2017.
- MORALES LONDOÑO, Diana Marcela et al. Efeitos do milho transgênico sobre aspectos morfofisiológicos da associação micorrízica e sobre a diversidade dos fungos micorrízicos arbusculares. 2016.

MOREIRA, Fátima; SIQUEIRA, José Oswaldo.. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora Ufla, 2006.

MORENO, A. L.; KUSDRA, J. F.; PICAZEVICZ, A. A. C. Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense* e nitrogênio. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.5, p.287-294, 2019.

MOTES, William C. Modern Agriculture and Its Benefits–Trends, Implications and Outlook. **Global Harvest Initiative, Washington, DC**, 2010.

MYKE® PRO PRODUCTS. **Mycorrhizal inoculants**. 2022. Disponível em: <http://www.mykepro.com/myke-pro-mycorrhizae-product.aspx> Acesso em: 25 Jan 2023.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, 1999. 399 p.

OKUMURA, Ricardo Shigueru; DE CINQUE MARIANO, Daiane; ZACCHEO, Paulo Vicente Contador. Use of nitrogen fertilizer in corn. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011.

OLIVEIRA-PAIVA, CA et al. Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. 2020.

PÃES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. 2006

PINTER, I.F. et al. Characterization of the tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown grapevine. **Applied Soil Ecology**. v.109, p.60-68. 2017.

RANUM, Peter; PEÑA-ROSAS, Juan Pablo; GARCIA-CASAL, Maria Nieves. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the new York academy of sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

REETZ, Harold F. Fertilizantes e o seu uso eficiente. **São Paulo: ANDA**, v. 178, 2017.

REINHARDT, D. Programming good relations—development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in plant biology**, v.10, n. 1, p. 98-105, 2007.

REPKE, Rodrigo Alberto et al. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, p. 214-226, 2013.

RIBEIRO, Vitória Palhares et al. Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 2, p. 1-13, 2022.

RIBEIRO, Vitória Palhares et al. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 40-46, 2018.



RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**. V. 84, n. 4, p. 355-363, 2004.

RITCHIE, Steven W.; HANWAY, John J.; BENSON, Garren O. Como a planta de milho se desenvolve. **Informações agronômicas**, v. 103, p. 1-19, 2003.

SANDERS, Erin R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 63, p. e3064, 2012.

SANGOI, L.; SILVA, PRF da; ARGENTA, G. Estratégias de manejo do arranjo de plantas para aumentar o rendimento de grãos de milho. **Lages: Graphel**, 2010.

SANTI, Carole; BOGUSZ, Didier; FRANCHE, Claudine. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Outstanding impact of *Azospirillum* brasilense strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021.

SANTOS, Ronisley Pereira et al. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. 2008.

SANTOYO, Gustavo et al. Plant growth stimulation by microbial consortia. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 219, 2021.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZITT, D.; WALKER, A. new phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. **Mycologi Research**, v. 105, n. 12, p. 2001, 2001.

SHAH, S. et al. Potential and prospect of plant growth promoting rhizobacteria in lentil. *In*: SINGK, A.K; SANGLE, U. **Scientific lentil production**. Delhi: Satish Serial Publishinh House, 2018

SIGNOR, Diana; CERRI, Carlos Eduardo P.; CONANT, Richard. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 015013, 2013.

SILVA, André Silas Lima et al. Promoção de crescimento em milho pela inoculação e coinoculação de *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. 2022.

SILVA, E.P.D. **Caracterização de bactérias associativas da bracatinga (*Mimosa scabrella Benth.*) e potencial aplicação em áreas de mineração de carvão em recuperação**. 2020.96 p. Tese (Doutorado em Recurso Genéticos Vegetais) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

SILVA, Elijanara Raissa et al. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.). **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 325-335, 2019.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**, 3rd Edn. London: Academic. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO (SBCS). Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e**

SPAGNOLETTI, Federico; LAVADO, Raúl S. The arbuscular mycorrhiza *Rhizophagus intraradices* reduces the negative effects of arsenic on soybean plants. **Agronomy**, v. 5, n. 2, p. 188-199, 2015.

SPOLAOR, Leandro Teodoski et al. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, p. 33-40, 2016.

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

STOFFEL, Shantau Camargo Gomes et al. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, v. 22, p. 181-188, 2016.

STOFFEL, Shantau Camargo Gomes et al. Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, 2020b.

STOFFEL, Shantau Camargo Gomes et al. Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 5, p. 702-713, 2020<sup>a</sup>.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TEDESCO, M. J.; et al. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Boletim Técnico de Solos, 5. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS.174 p. 1995.

TIWARI, S.; PRASAD, V.; CHAUHAN, O. S.; LATA, C. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1510, 2017.

TURAN, M. et al. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 175, n. 6, p. 818-826, 2012.

VEIGA, R. S. L. et al. Can Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce the Growth of Agricultural Weeds? **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e27825, 2dez. 2011.

VERBAENDERT, Ines; DE VOS, Paul. Studying denitrification by aerobic endospore-forming bacteria in soil. **Endospore-forming soil bacteria**, p. 271-285, 2011.

WAHYUDI, Aris Tri et al. Characterization of *Bacillus sp.* strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **J Microbiol Antimicrob**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.

WU, J.-T. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi effect growth and photosynthesis of *Phragmites australis* (Cav) Trin x. Steudel under copper stress. **Plant Biology**, v. 22, n 1, p. 62-69, 2020.

YU, Jianming; BUCKLER, Edward S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 155-160, 2006.

ZAMIOUDIS, C. et al. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.