



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**CIANOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO (*Zea mays* L.)**

Londrina
2017

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**CIANOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Guimarães.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Diva Souza Andrade.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gavilanes, Freddy Eli Zambrano.

Cianobactérias na promoção do crescimento e produtividade do milho (*Zea mays* L.) / Freddy Zambrano Gavilanes. - Londrina, 2017.
121 f.

Orientador: Maria de Fátima Guimarães .

Coorientador: Diva Souza Andrade.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Anabaena cylindrica* - Tese. 2. *Nostoc muscorum* - Tese. 3. *Azospirillum brasilense* - Tese. 4. Poaceae - Tese. I. Guimarães , Maria de Fátima . II. Andrade, Diva Souza . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**CIANOACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima
Guimarães
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-Orientadora: Profa. Dra. Diva Souza
Andrade
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Prof. Dr. Alvadi Antonio Balbinot
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Profa. Dra. Adriana Pereira da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marla Alessandra de Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 1 de dezembro de 2017.

Dedico este trabalho à minha amada esposa Thaináh, aos meus queridos pais Freddy e Marianita e a minha irmã Patricia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que guia os meus passos todos os dias e me mostra o caminho certo da vida.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade concedida para realização do Doutorado.

Ao Instituto Agronômico Paraná, onde se desenvolveu parte do presente trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida, que foi de relevante importância.

Agradeço, de forma especial, aos meus orientadores Dra. Maria de Fátima Guimarães, Dra. Diva Souza Andrade e Dr. Claudemir Zucareli, pela valiosa ajuda apoio, amizade, confiança, paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês não teria sido possível o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigado por tudo.

Aos membros da banca, examinadora por ter aceitado o convite e por todas as sugestões que ajudaram a melhorar a qualidade do presente trabalho.

À o Antônio Rosa pela sua grande ajuda no desenvolvimento dos experimentos em campo e casa de vegetação.

À o Helder Silva e Rafael Nomura, muito obrigado pela inestimável colaboração e por sua grande amizade.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR e dos Laboratórios de Solos e Fitotecnia da UEL, que de alguma forma ajudaram a contribuir com este trabalho.

A todos que fizeram e fazem parte da minha vida,

Muito Obrigado

“A conquista é dos persistentes e acontece batalha por batalha, dia a dia, e quanto mais difícil a luta, maior a recompensa.”

Fabricio S. Cruvinel

ZAMBRANO, Freddy Eli Gavilanes. **Cianobactérias na promoção do crescimento e produtividade do milho (*Zea mays* L.)**. 2017.121f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O nitrogênio (N) é considerado um dos nutrientes mais requeridos pela cultura do milho, estando relacionado com a sua produção, entretanto, sujeito a perdas no solo por lixiviação, escoamento superficial e volatilização, provocando prejuízos ambientais. A aplicação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs), para o incremento da produção agrícola é uma das alternativas mais importantes para depender menos dos fertilizantes químicos. As BPCPs estimulam a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Algumas espécies de cianobactérias têm essa capacidade além de produzir hormônios promotores de crescimento favorecendo as diferentes culturas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de cianobactérias no desenvolvimento e produção da cultura de milho. O trabalho foi dividido em três artigos: o primeiro teve por objetivo avaliar a taxa de crescimento da *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima*, em meio BG11 modificado, e o efeito de suas inoculações em sementes de milho em câmara de crescimento e em casa de vegetação; As cianobactérias apresentaram crescimento diferenciado *in vitro* em meio de cultura BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, até o quinto dia. *Nostoc muscorum* e *Anabaena cylindrica*, independente dos meios de cultura, tiveram efeitos no desenvolvimento inicial de plântulas de milho na maioria das variáveis avaliadas. As cianobactérias associadas com *Azospirillum brasilense* tem alto potencial para favorecer a cultura do milho, pelo aumento da massa e volume radicular, assim como o incremento da massa e área foliar, demonstrando que a coinoculação entre *Anabaena cylindrica* e *Azospirillum brasilense* tem grande potencial para a cultura de milho. O segundo experimento teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho cultivado com diferentes doses de nitrogênio de cobertura em resposta à inoculação com cianobactérias (*Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*). As características fitométricas e desempenho produtivo do milho não foram alteradas pela interação entre doses de N e inoculantes, demonstrando que as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias. A inoculação com *Anabaena cylindrica* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo do milho e resultou em incremento na produtividade de grãos em 912 kg ha⁻¹ (20,46%) na safra 1 e de 1020 kg ha⁻¹ (21,11%) na safra 2, em relação ao não inoculado. O terceiro experimento teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e desempenho produtivo de quatro híbridos de milho. A coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo dos híbridos de milho, com incremento de 967 kg ha⁻¹ (9,37%) em Londrina e 1744 kg ha⁻¹ (23,1%) em Faxinal, em relação ao controle não inoculado. Em relação aos híbridos de milho, estes apresentaram o mesmo comportamento, independentemente da inoculação ou coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Anabaena cylindrica*, o que sugere que a inoculação não apresenta resposta específica do genótipo de milho.

Palavras-chave: *Anabaena cylindrica*. *Nostoc muscorum*. *Calothrix brevissima*. *Azospirillum brasilense*. Bactérias diazotróficas. Fixação biológica de Nitrogênio. Poaceae.

ZAMBRANO, Freddy Eli Gavilanes. **Cyanobacteria in promoting the growth and yield of maize (*Zea mays* L.)**. 2017. 121p. Thesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is considered one of the most required nutrient by the maize crop being associated with its production, however, subject to losses in the soil by leaching, and runoff volatilization, causing environmental damage. The application of plant growth promoting bacteria (PGPB) to increase agricultural production is one of the most important alternatives for relying less on chemical fertilizers. (PGPB) stimulate biological nitrogen fixation (BNF). Some species of cyanobacteria have this ability in addition to producing growth promoting hormones favoring different cultures. This study aimed to evaluate the effects of cyanobacteria in the development and production of the maize crop. The work was divided in three articles: the first one was to evaluate the growth rate of *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* and *Calothrix brevissima*, in modified BG11 medium, and the effect of its inoculations on maize seeds in growth and greenhouse; The cyanobacteria presented differentiated growth in vitro in BG11 culture medium without N supplemented with yeast extract, until the fifth day. *Nostoc muscorum* and *Anabaena cylindrica*, independent of the culture media, had effects on the initial development of maize seedlings in most of the evaluated variables. The cyanobacteria associated with *Azospirillum brasilense* have a high potential to favor maize cultivation, by increasing root mass and volume, as well as increasing mass and leaf area, demonstrating that the co-inoculation between *Anabaena cylindrica* and *Azospirillum brasilense* has great potential for cultivation of corn. The second article aimed to evaluate the development and productive performance of maize cultivated with different doses of cover nitrogen in response to inoculation with cyanobacteria (*Anabaena cylindrica* and *Nostoc muscorum*). The phytometric characteristics and yield of maize were not altered by the interaction between N doses and inoculants, demonstrating that N doses do not interfere with cyanobacteria performance. The inoculation with *Anabaena cylindrica* favored the development and productive performance of maize and resulted in an increase in grain yield of 912 kg ha⁻¹ (20.46%) in crop 1 and 1020 kg ha⁻¹ (21.11%) in crop 2, in relation to the non-inoculated. The third article aimed to evaluate the effects of inoculation and co-inoculation of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* on the development and productive performance of four maize hybrids. The co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* favored the development and productive performance of maize hybrids, with an increase of 967 kg ha⁻¹ (9.37%) in Londrina and 1744 kg ha⁻¹ (23.1%) in Faxinal, in relation to the control. Regarding the maize hybrids, they showed the same behavior regardless of inoculation or co-inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Anabaena cylidrica*, which suggests that the inoculation does not present a specific response of the maize genotype.

Key words: *Anabaena cylindrica*. *Nostoc muscorum*. *Calothrix brevissima*. *Azospirillum brasilense*. Diazotrophic bacteria. Biological nitrogen fixation. Poaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Fases de desenvolvimento da cultura do milho	21
Figura 2.2 – Cianobactéria <i>Nostoc muscorum</i>	32
Figura 2.3 – Cianobactéria <i>Anabaena cylindrica</i>	33
Figura 2.4 – Cianobactéria <i>Calothrix brevissima</i>	34
Figura 3.1 – Biomassa seca (g L ⁻¹) das cianobactérias <i>N. muscorum</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C. brevissima</i> , crescidas em meio BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura	52
Figura 3.2 – Teor de clorofila a (µg mL ⁻¹) no meio cultivado com as cianobactérias <i>N. muscorum</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C.</i> <i>brevissima</i> , crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura	54
Figura 3.3 – Teor de carotenóides (µg L ⁻¹) no meio cultivado com as cianobactérias <i>N. muscorum</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C.</i> <i>brevissima</i> , crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura	56
Figura 3.4 – Teor de Nitrogênio (µg L ⁻¹) em meio cultivado com as cianobactérias <i>N. muscorum</i> , <i>A. cylindrica</i> , <i>Anabaena sp.</i> e <i>C.</i> <i>brevissima</i> , crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura	58
Figura 3.5 – pH do meio de cultura cultivado com as cianobactérias <i>N.</i> <i>muscorum</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C. brevissima</i> , crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura	59
Figura 4.1 – Precipitação pluvial e temperaturas do ar, máxima e mínima (T máx e T mín) no município de Londrina Paraná, referente aos períodos experimentais	75
Figura 5.1 – Precipitação pluvial e temperaturas do ar, máxima e mínima (T máx e T mín) do município de Londrina e Faxinal	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Meios de cultura sintéticos BG-11, Zarrouk's médium e High Salt Medium, para crescimento e manutenção de cianobactérias.....	35
Tabela 3.1 – Caracterização de biomassa úmida, massa seca, unidades formadoras de colônias (UFC), clorofila a, clorofila b, clorofila c e carotenóides de quatro cianobactérias utilizadas como inoculantes.....	43
Tabela 3.2 – Germinação de sementes de milho inoculadas com cianobactérias e avaliação de plântulas em câmara de crescimento	61
Tabela 3.3 – Resumo da análise de variância (p). Características fitométricas de plantas de milho cujas sementes foram inoculadas com cianobactérias, com e sem adição de N mineral.....	62
Tabela 3.4 – Características fitométricas de plantas de milho em resposta à inoculação com cianobactérias, na média de dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura	63
Tabela 3.5 – Características fitométricas de plantas de milho em resposta a dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura, média de seis níveis de inoculação.....	64
Tabela 3.6 – Desdobramento da interação para área foliar, em resposta à inoculação com cianobactérias em dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura	65
Tabela 3.7 – Resumo da análise de variância (p). Coinoculação de cianobactérias com <i>Azospirillum brasilense</i> em genótipos de milho	66
Tabela 3.8 – Características fitométricas de plantas de milho em resposta a coinoculação com cianobactérias e <i>A. brasilense</i> , média de dois genótipos de milho	68
Tabela 3.9 – Características fitométricas de plantas de milho em resposta a dois genótipos, média de seis níveis de inoculação.....	68
Tabela 3.10 – Desdobramento da interação para K foliar, em resposta a coinoculação com cianobactérias e <i>A. brasilense</i> e genótipos de milho	69

Tabela 4.1 –	Resumo da análise de variância (p) das características fitométricas, componentes de produção, e produtividade da cultura do milho inoculado com duas cianobactérias e com <i>Azospirillum brasilense</i> , sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura	79
Tabela 4.2 –	Características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta à inoculação com cianobactérias e <i>Azospirillum brasilense</i> , média de quatro doses de nitrogênio.....	80
Tabela 4.3 –	Características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta à quatro doses de nitrogênio, na média de inoculação com cianobactérias e <i>Azospirillum brasilense</i>	82
Tabela 4.4 –	Produtividade (kg ha ⁻¹) e incremento de grãos de milho inoculado com cianobactérias e <i>Azospirillum brasilense</i> sob quatro doses de nitrogênio em cobertura	83
Tabela 5.1 –	Principais características dos híbridos de milho usados no experimento	92
Tabela 5.2 –	Resumo da análise de variância (p) das características fitométricas, componentes de produção e produtividade de grãos de híbridos de milho em resposta a inoculação e coinoculação de cianobactéria com <i>Azospirillum brasilense</i>	95
Tabela 5.3 –	Características fitométricas e componentes de produção de híbridos de milho em resposta à inoculação e coinoculação de cianobactéria com <i>Azospirillum brasilense</i> , média de quatro híbridos	96
Tabela 5.4 –	Características fitométricas e componentes de produção de diferentes híbridos de milho, média de quatro níveis de inoculação	98
Tabela 5.5 –	Desdobramento da interação para número de grãos por fileira em resposta a inoculação e coinoculação de cianobactéria com <i>Azospirillum brasilense</i> no desenvolvimento e desempenho produtivo de híbridos de milho.....	99
Tabela 5.6 –	Produtividade e incremento de produtividade de grãos (kg ha ⁻¹ e em %) em resposta a inoculação e coinoculação de cianobactéria com <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes híbridos de milho	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
IPR	Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)
N	Nitrogênio
P	Fósforo
K	Potássio
AC ou Acy	Anabaena cylindrica
NM ou Nmu	Nostoc muscorum
CB	Calhotrix brevissima
AS	Anabaena sp.
AB ou Abr	Azospirillum brasilense
CTR	Controle
I	Inoculantes
MC	Meios de cultura
D	Doses
A	Adubação
G	Genótipo
AP	Altura de planta
AIE	Altura da inserção de espiga
DC	Diâmetro do colmo
AF	Área foliar
IAF	Índice de área foliar
MR	Massa da raiz
VR	Volume de raiz
MF	Massa foliar
MC	Massa do caule
Chl a	Clorofila a
Chl b	Clorofila b
NFE	Número de fileiras de grãos por espiga
NGF	Número de grãos por fileira
NGE	Número de grãos por espiga
PROL	Número de espigas por plantas
NS	Teor de Nitrogênio das sementes
MMG	Massa de 1000 grãos
PROD	Produtividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A CULTURA DO MILHO.....	17
2.1.1	Importância da Cultura do Milho	18
2.1.2	Melhoramento Genético da Cultura do Milho.....	18
2.1.3	Fenologia da Cultura do Milho	21
2.1.4	Fatores ambientais que Afetam na Cultura do Milho.....	22
2.1.5	Sistema de Produção do Milho	23
2.1.6	O Nitrogênio na Cultura de Milho	24
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	26
2.2.1	Inoculantes.....	28
2.2.2	Inoculantes na Cultura do Milho.....	28
2.3	CIANOACTÉRIAS.....	30
2.3.1	Taxonomia de Cianobactérias.....	32
2.3.1.1	Nostoc muscorum	32
2.3.1.2	Anabaena.....	33
2.3.1.3	Calothrix brevíssima.....	34
2.3.2	Cultivo de Cianobactérias	35
2.3.3	Fixação Biológica em Cianobactérias	36
2.3.4	Uso de Cianobactérias na Cultura de Milho	37
3	ARTIGO A. CIANOACTÉRIAS: CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTIVO E INOCULAÇÃO EM SEMENTES MILHO	40
3.1	RESUMO	40
3.2	ABSTRACT.....	41
3.3	INTRODUÇÃO	42
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.4.1	Obtenção e manutenção das Cianobactéria	43

3.4.2	Ensaio 1: Crescimento de cianobactérias em meio BG11 modificado.....	44
3.4.2.1.	Preparo e caracterização dos inóculos	44
3.4.2.2.	Crescimento das cianobactérias	44
3.4.3	Ensaio 2: Cianobactérias na germinação e desenvolvimento inicial do milho.....	46
3.4.4	Ensaio 3: Características fitométricas do milho com e sem adubação nitrogenada e inoculado com cianobactérias.....	48
3.4.5	Ensaio 4: Coinoculação de cianobactérias com <i>Azospirillum brasilense</i> em genótipos de milho.....	49
3.4.6	Análises estatísticas.....	50
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.5.1	Ensaio 1: Crescimento de cianobactérias em meio BG11 modificado.....	51
3.5.2	Ensaio 2: Cianobactérias na germinação e desenvolvimento inicial do milho.....	61
3.5.3	Ensaio 3: Características fitométricas do milho com e sem adubação nitrogenada e inoculado com cianobactérias.....	63
3.5.4	Ensaio 4: Coinoculação de cianobactérias com <i>Azospirillum brasilense</i> em genótipos de milho.....	66
3.6	CONCLUSÕES.....	70
4	ARTIGO B. CIANOBACTÉRIAS NO DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO PRODUTIVO DO MILHO CULTIVADO SOB DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO	72
4.1	RESUMO	72
4.2	ABSTRACT.....	73
4.3	INTRODUÇÃO.....	74
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.6	Conclusões	86

5	ARTIGO C: COINOCULAÇÃO DE <i>Anabaena cylindrica</i> COM <i>Azospirillum brasilense</i> NO DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO PRODUTIVO DE HÍBRIDOS DE MILHO.....	87
5.1	Resumo.....	87
5.2	ABSTRACT.....	88
5.3	INTRODUÇÃO.....	89
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	91
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.6	CONCLUSÕES.....	103
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	104
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes do mundo e no Brasil é a segunda cultura de maior importância depois da soja, sendo utilizado o seu grão principalmente como base alimentar da população e componente básico em rações alimentícias de aves e suínos. Assim também, tem sido usado para a fabricação do etanol para biocombustíveis.

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho, destacando-se as condições edafoclimáticas, o material genético, o manejo da cultura, e disponibilização de macro e micronutrientes, dos quais o Nitrogênio (N) é o nutriente mais limitante. As fontes nitrogenadas mais empregadas são a ureia e o sulfato de amônio, provenientes de derivados do petróleo, que acarretam danos ambientais, sujeitos a perdas de nitrogênio por lixiviação, escoamento superficial, volatilização da amônia e desnitrificação, além de custos de produção para a cultura.

Diferentes trabalhos estão sendo realizados para diminuir o uso de fertilizantes convencionais e torná-los solúveis e disponíveis para os vegetais, sobressaindo a utilização de microrganismos como as Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs), uma das alternativas mais relevantes. Algumas BPCPs, com capacidade de estimular o crescimento da parte aérea e radicular das plantas, proporcionar tolerância a estresses e controle biológico. Assim também, algumas como as diazotróficas, promovem a fixação biológica do nitrogênio (FBN), que é um processo de redução do nitrogênio atmosférico (N₂) a amônio, sendo uma opção apropriada sob os aspectos econômicos e ambientais, reduzindo em grande medida o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

Atualmente estão sendo comercializados inoculantes a partir de bactérias do gênero *Azospirillum*, para poáceas como o milho e trigo, assim como rizóbios para fabáceas como soja e feijão, incrementando a produtividade dessas culturas.

Alguns microrganismos procarióticos fotossintetizantes chamados de cianobactérias, também têm a capacidade da promoção de crescimento vegetal por ter compostos como as axinas, giberelinas e citocininas, além do mecanismo da fixação biológica do nitrogênio (FBN) por ser heterocistadas, podendo ser utilizados em substituição total ou parcial aos fertilizantes nitrogenados. Entretanto, são pouco explorados para o uso como inoculante para as diferentes culturas.

Efeitos benéficos da associação simbiótica entre a *Azolla* e cianobactéria do

gênero *Anabaena*, em plantações de arroz, são reportados na literatura, mencionando a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, ajudando a enriquecer fertilidade do solo e incrementando o rendimento da cultura.

Assim, mediante a inoculação, as cianobactérias têm potencial para aumentar a produtividade do milho pela disponibilização de nitrogênio e compostos promotores de crescimento.

Esta pesquisa tem como objetivo geral avaliar os efeitos de cianobactérias no desenvolvimento e produção da cultura de milho, e como objetivos específicos:

- Avaliar a taxa de crescimento da *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima*, em meio BG11 modificado e a inoculação destas em sementes de milho.

- Avaliar o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho cultivado em diferentes doses de nitrogênio de cobertura em resposta à inoculação com cianobactérias (*Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*) em duas safras de cultivo.

- Avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e desempenho produtivo de quatro híbridos de milho, em duas condições edafoclimáticas no estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) tem sido a cultura mais importante os povos ancestrais (DRESSLER, 1953). Registros arqueológicos mostram uma domesticação na América Central há cerca de 5800 anos A.E.C. e 3900 anos A.E.C. na América do Sul, a partir de um segmento do gene que codifica a álcool Desidrogenase 2 (*Adh2*), amplificada e sequenciada extraído de espécimes arqueológicas e contemporâneas de milho, mostrando que havia uma diversidade nestes momentos do passado (MANGELSDORF, 1974).

O pool genético do milho data de milhões de anos, e de raças domésticas originárias de várias populações selvagens ancestrais (GOLOUBINOFF et al., 1993). O milho representa uma das principais espécies domesticadas usadas na agricultura moderna, originada a partir de uma ou mais espécies do teosinte (*Zea mays parviglumis* e *Zea mays mexicana*) (FREITAS, 2002).

Na classificação botânica, o milho pertence à ordem Poales, família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. O caráter monoico e a sua morfologia característica resultam da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas. Os aspectos vegetativos e reprodutivos da planta podem ser modificados através da interação com os fatores ambientais que afetam o controle da ontogenia do desenvolvimento. Como resultado geral da seleção natural e da domesticação obteve-se uma planta anual, robusta e ereta, com um a quatro metros de altura, “construída” para a produção de grãos (MAGALHÃES, 2002).

A sua grande adaptabilidade, representada por variados genótipos, permite o seu cultivo desde o Equador até regiões temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3600 metros, encontrando-se, assim, em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS;CALADO, 2014).

O milho é cultivado em regiões cuja precipitação varia de 300 a 5.000 mm anuais, sendo a quantidade de água consumida durante o seu ciclo em torno de 600 mm (MAGALHÃES;DURÃES, 2006).

É uma planta anual, de crescimento determinado, com um extenso sistema radicular fibroso, com folhas alternadas em ambos os lados do colmo, pubescentes

na parte adaxial e glabras na parte abaxial. É uma espécie de polinização cruzada, com as flores separadas sobre as plantas, sendo estas do sexo feminino (espiga) e masculino (pendão). O grão se desenvolve na espiga, cada espiga tem cerca de 300 a 1000 grãos, pesando entre 190 e 300 g por 1000 grãos, em um número variável de linhas (12 a 16); com metabolismo fotossintético C4 (BOLAÑOS;EDMEADES, 1993; KOLE, 2007).

2.1.1 Importância da Cultura do Milho

O milho encontra-se entre as mais importantes culturas do mundo com aproximadamente 960 milhões de toneladas anuais. Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os maiores produtores, representando 70% da produção mundial (PEIXOTO, 2014). No Brasil é a segunda maior cultura produzida depois da soja, cultivada em duas safras por ano.

Segundo o levantamento da CONAB (2017), no Brasil o total da área consolidada plantada com milho atingiu 17.391,3 milhões de hectares com produção total de 96.026,2 milhões de toneladas, com produtividade variável nos diferentes Estados e regiões.

No Brasil, esse grão é significativo no domínio econômico e social, sendo usado na alimentação humana e animal, além de servir como matéria prima diversificada para diferentes processos industriais (SANTOS et al., 2015).

O milho tem assumido importante papel socioeconômico no Brasil, colocando-se em posição de relevância no que se refere ao valor da produção agropecuária, área plantada e volume produzido, em especial nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SEVERINO et al., 2006).

2.1.2 Melhoramento Genético da Cultura do Milho

A diversidade genética existente no milho permite o seu cultivo nos mais diversos ambientes, cresce a latitude 58° N no Canadá e na ex-União Soviética até latitude 40° S no hemisfério sul. Também é cultivado em regiões abaixo do nível do mar, na planície do mar Cáspio e em altitudes de mais de 4000 m nos Andes Peruanos. É uma espécie diploide com um número de cromossomas de $2n=2x=20$, e tem um tamanho de genoma moderado de cerca 2400 Mb (KOLE, 2007).

O germoplasma de milho é constituído por raças crioulas (locais), populares adaptadas e materiais exóticos introduzidos, sendo caracterizado por uma ampla variabilidade genética. De maneira geral, as populações crioulas são menos produtivas que os genótipos comerciais. Entretanto, essas populações são importantes por constituírem fonte de variabilidade genética que pode ser explorada na busca por genes tolerantes e/ou resistentes a fatores bióticos e abióticos (ARAÚJO;NASS, 2002).

O desenvolvimento do milho híbrido ocorreu a partir da visão de Darwin sobre a fertilização cruzada aumentando o vigor. Os princípios de Darwin de seleção natural e artificial para adaptação durante o crescimento de milho de polinização aberta no cinturão do milho (Corn Belt) nos Estados Unidos, seguido do objetivo das empresas de sementes híbridas de fornecer híbridos mais amplamente adaptados (mais resistentes a intempéries, mais estáveis), explica a preeminência (cerca de 73%) do milho dentado também conhecido como milho amarelo (Reid Yellow Dent), nos EUA (TROYER, 2006; 2009).

A importância dos programas de melhoramento genético no desenvolvimento dos híbridos simples, de ciclo curto, alteraram o ideótipo dos cultivares de milho, produzindo uma planta de arquitetura mais compacta, melhor adaptada ao adensamento e mais eficiente em converter a fitomassa produzida à produção de grãos (SANGOI, 2010).

A diminuição da altura de plantas e da inserção de espigas, do tamanho do pendão, do número de folhas, da área foliar, bem como o aumento da uniformidade morfológica e fenológica, da força de dreno da espiga, da sincronia entre antese/espigamento e do índice da colheita, são características que contribuíram para a maior eficiência dos híbridos contemporâneos no aproveitamento de água, luz e nutrientes, principalmente em ambientes de alta competição intra-específica (SANGOI, 2010).

As plantas transgênicas são produtos obtidos a partir da modificação genética ou transformação de plantas, cuja criação envolve a inserção de DNA no genoma em uma ou mais sequências de pares de nucleotídeos, geralmente isoladas de uma ou mais espécies, para garantir a expressão gênica de um ou mais genes de interesse (LERAYER et al., 2006).

Os transgênicos derivam de cultivares convencionais por métodos de reprodução clássicos e são conhecidos como híbridos isogênicos. Desta forma,

teoricamente, os híbridos isogênicos não devem apresentar diferenças na sua composição genética devido à tecnologia de DNA recombinante usada para criá-los, exceto o inserto de DNA transformante. Contudo, os eventos dos transgênicos podem interferir na adaptabilidade e estabilidade desses materiais (PRADO et al., 2016).

Plantas geneticamente modificadas desenvolvidas para resistir ao ataque de insetos-praga podem, potencialmente, reduzir impactos negativos da agricultura ao ambiente em virtude da redução do uso de inseticidas químicos na cultura, com consequentes benefícios, como redução de poluição por resíduos tóxicos no ambiente (solo, água e alimentos ou matéria-prima), e aumento da segurança do trabalhador e possivelmente do controle biológico natural (MENDES et al., 2011).

O milho transgênico com o gene do Bt, recebeu genes específicos da bactéria *Bacillus thuringiensis* que promovem na planta a produção de uma proteína tóxica específica para determinados grupos de insetos. Entre os que estão sendo comercializados, destacam-se os que expressam as toxinas Cry 1A(b) e Cry 1F, com atividade sobre os lepidópteros, e o Cry3Bb1, para o controle de coleópteros (larvas de *Diabrotica* spp.) e mais recente o Cry1A.105 e Cry2Ab2, que representa uma segunda geração de milho transgênico resistente a insetos, pois produz simultaneamente duas proteínas derivadas do *Bacillus thuringiensis*, ativas contra lagartas-praga (LOGUERCIO et al., 2002; WAQUIL et al., 2010).

A característica de tolerância ao glyphosate de híbridos de milho RR® (Roundup Ready®) possibilita que esse único herbicida seja utilizado com seletividade à cultura, mas de forma contrária, impossibilita o controle com esse herbicida de altas populações do próprio milho RR®, são plantas voluntárias (GOES MACIEL et al., 2013).

Conforme Pereira Filho;Borghini (2016), estão disponíveis na safra 2016/17 para os produtores brasileiros 315 genótipos de milho, dos quais 214 materiais apresentam alguma tecnologia transgênica para o controle de pragas e/ou resistência ao glifosato. Este número de cultivares com eventos transgênicos representa 67,93% das cultivares que fizeram parte do mercado de milho para esta safra. Destes, 103 apresentam as tecnologias VT PRO (47 genótipos), VT PRO2 (32 genótipos) e VT PRO3 (24 genótipos). Os 101 genótipos que completam o levantamento não apresentam nenhuma tecnologia transgênica (convencionais) e representam 32,06% em relação ao total de materiais disponíveis. Desses materiais

são 67,61% híbridos simples, 16,82% híbridos triplos, 6,03% híbridos duplos, 5,07% variedades, 3,17% híbridos simples modificados e 0,63% são híbridos triplos modificados entre 315 materiais relacionados.

2.1.3 Fenologia da Cultura do Milho

Todas as plantas de milho seguem um mesmo padrão de desenvolvimento. Entretanto, o intervalo entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas pode variar entre genótipos, ano agrícola, data de plantio e local. Os estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho (Figura 1) são: na Fase vegetativa (V), a partir da emergência (V_E), V_1 , V_2 , V_3 até V_n ; em que (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento (V_T). Todas as folhas e espigas que a planta eventualmente irá produzir são formadas no V_3 . Pode-se dizer, portanto, que o estabelecimento do número máximo de grãos, ou a definição da produção potencial, estão sendo definidos nesse estádio (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

No estádio V_5 (cinco folhas completamente desenvolvidas), tanto a iniciação das folhas como das espigas está completa e a iniciação do pendão já pode ser vista microscopicamente, na extremidade de formação do caule, logo abaixo da superfície do solo. O estádio V_T inicia-se quando o último ramo do pendão está completamente visível. Durante esta fase, cada estádio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo. Assim, a primeira folha de cima para baixo, com o colar visível, é considerada completamente desenvolvida, sendo contada como tal. A fase reprodutiva (R), tem início com o florescimento (R_1), compreendendo a visualização dos estilos - estigmas fora das brácteas. Os estádios posteriores são o de grão leitoso (R_2) de 10 a 14 dias após o florescimento, grão pastoso (R_3) de 18 a 22 dias após o florescimento, grão farináceo (R_4) de 24 a 28 dias após o florescimento, grão farináceo duro (R_5) de 35 a 42 dias após o florescimento e a maturidade fisiológica (R_6) de 55 a 65 dias após o florescimento (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

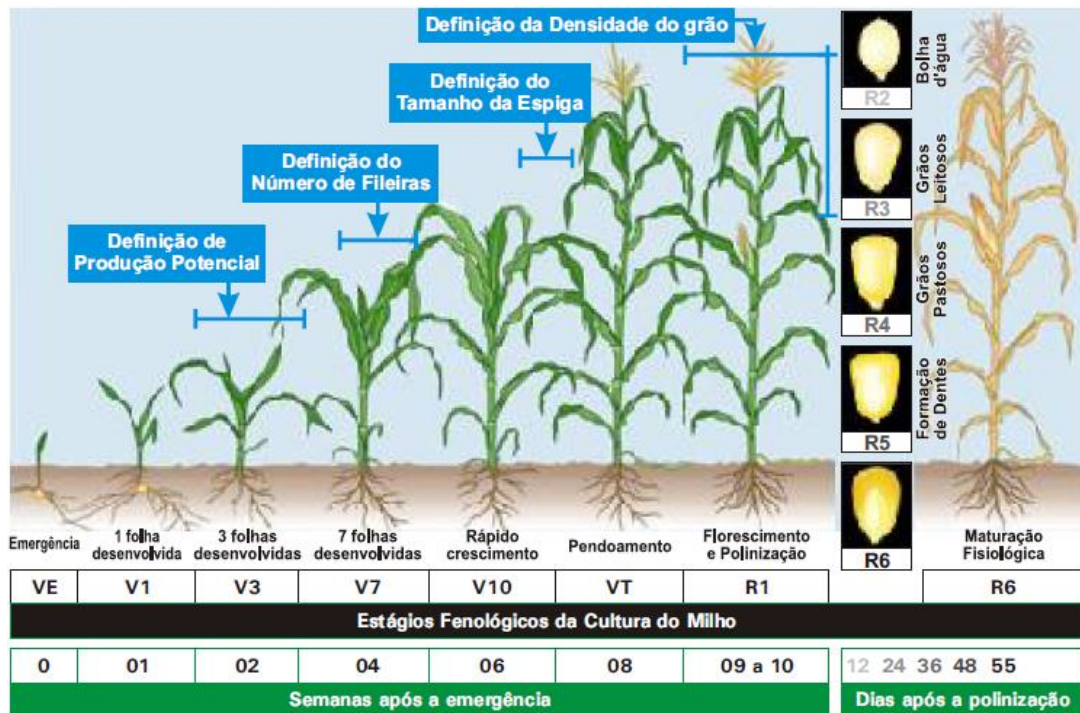


Figura 2.1 – Fases de desenvolvimento da cultura do milho (WEISMANN, 2008).

2.1.4 Fatores Ambientais que Afetam a Cultura do Milho

Altos rendimentos de grãos de milho resultam do sucesso em se utilizar os fatores do ambiente com máxima eficiência, minimizando as causas adversas ao desenvolvimento das culturas. Esta complexa equação é dependente, principalmente, de três elementos meteorológicos: radiação solar, temperatura do ar e disponibilidade hídrica. A obtenção de elevado rendimento de grãos passa pela análise de cada um destes elementos, que interagem entre si (RODRIGUES et al., 2011).

A interceptação da radiação fotossinteticamente ativa pelas plantas exerce grande influência sobre a sua performance quando outros fatores ambientais são favoráveis. Nos ecossistemas natural e cultivado, a atividade fotossintética das plantas resulta na conversão da energia solar em energia química, a qual é essencial para a produção vegetal, sendo a cultura do milho muito demandante da energia luminosa (ARGENTA;SANGOI, 2001).

O milho pertence ao grupo de plantas com metabolismo fotossintético do tipo C_4 , que se caracteriza pelo elevado potencial produtivo. Entre as plantas C_4 , o milho está no grupo de espécies com maior eficiência de uso da radiação solar ou

eficiência quântica, com valor médio entre 64,5 a 69 mmol mol^{-1} , enquanto outras espécies C_4 apresentam valores em torno de 52,6 a 60,4 mmol mol^{-1} (BERGAMASCHI et al., 2004).

O milho responde muito bem a alta temperatura, desde que haja suficiente umidade de solo (a indicação do início da semeadura é quando o solo está com temperatura $\geq 16^\circ\text{C}$) (GALON et al., 2011).

A disponibilidade hídrica é o fator que mais frequentemente limita a obtenção de elevado rendimento de grãos. O consumo diário de água durante o ciclo da cultura varia de 2 a 7 mm, dependendo do estágio e da demanda atmosférica. A maior exigência ocorre durante o pendoamento e espigamento (em torno de 7 mm/dia), quando a planta tem a maior área foliar (WESTGATE, 1994).

2.1.5 Sistema de Produção do Milho

O milho é uma planta de ciclo vegetativo variado, evidenciando desde cultivares extremamente precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até mesmo aqueles cujo ciclo vital pode alcançar 300 dias. Nas condições brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo que varia de 110 a 180 dias de acordo com a classificação dos materiais em superprecoce, precoce ou normal, período compreendido entre a emergência e a maturação (MEINICKE NASCIMENTO et al., 2011).

No Brasil são considerados dois períodos para o cultivo de milho, sendo estes a safra e a safrinha (também denominada segunda safra). Na safra o milho é semeado de julho a janeiro e o milho safrinha, refere-se ao cultivo extemporâneo do milho, com a semeadura sendo realizada entre os meses de janeiro a abril. A época ideal depende dos fatores ambientais e edáficos do local do plantio, sendo necessário seguir o calendário agrícola de cada região (FORNASIERI FILHO, 2007).

Magalhães (2002) menciona a produtividade da cultura do milho é o resultado da capacidade de assimilação da planta, do período disponível para a assimilação e das influências favoráveis e prejudiciais dos fatores ambientais, como: CO_2 , luz, temperatura, aparato foliar, nutrientes, condições hídricas, pragas e doenças, grãos polinizados e desenvolvidos, quantidade de fotoassimilados disponíveis (fotossíntese), etc.

A profundidade de semeadura do milho está condicionada aos fatores

temperatura do solo, umidade e tipo de solo. A semente deve ser colocada em uma profundidade que possibilite um bom contato com a umidade do solo. Em solos pesados, as sementes devem ser colocadas entre 3 e 5 cm de profundidade. Já em solos mais leves ou arenosos, as sementes podem ser colocadas mais profundas, entre 5 e 7 cm de profundidade, para se beneficiarem da maior umidade do solo (CRUZ et al., 2010).

Para cada sistema de produção, existe uma população que maximiza o rendimento de grãos. A população recomendada para maximizar o rendimento de grãos de milho varia de 40.000 a 80.000 plantas ha⁻¹, dependendo da disponibilidade hídrica, da fertilidade do solo, do ciclo do material, da época de semeadura e do espaçamento entre linhas. A densidade afeta as características do rendimento de grãos, índice e tamanho de espigas, diminuição do diâmetro do colmo, susceptibilidade ao acamamento e doenças (CRUZ et al., 2010).

Demétrio et al. (2008) determinaram que o melhor arranjo de plantas para híbridos de alto potencial é de 0,40 m de espaçamento entre linhas e de 75 mil e 80 mil plantas por hectare de densidade populacional.

2.1.6 O Nitrogênio na Cultura de Milho

O nitrogênio (N) encontra-se no solo principalmente na forma orgânica (aproximadamente 98%). A outra pequena parte encontra-se em formas minerais de amônio, nitrato e nitrito. A mineralização é a transformação biológica do N orgânico em N inorgânico, executada pelos microrganismos heterotróficos do solo. A imobilização refere-se ao processo inverso, ou seja, é a transformação do N inorgânico em orgânico. Os microrganismos do solo assimilam as formas inorgânicas de N para formar os constituintes orgânicos de suas células. Os compostos sintetizados pelos microrganismos podem ser mineralizados e tornar-se disponíveis para as plantas (ALFAIA, 2006).

As fontes nitrogenadas mais empregadas para o milho são a ureia e o sulfato de amônio. Ambas estão sujeitas a perdas de N (ALVA et al., 2006). O N assimilado pelos vegetais pode, em parte, perder-se tanto pelas raízes, por exsudação, como pela parte aérea, por volatilização, principalmente na forma de amônia, por lixiviação de compostos solúveis na água das chuvas, ou mesmo por

gutação, o que acarreta subestimativas no uso de fertilizantes feitas na maturidade (TRIVELIN et al., 2002).

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o mais caro, o que consome mais energia para o processo de fabricação e potencialmente é o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal (FRANCO et al., 1999).

Os fertilizantes nitrogenados sintéticos são fabricados a partir da amônia anidra. As atuais fabricas de amônia para fins fertilizantes no Brasil utilizam gás natural, gás de refinaria ou resíduo asfáltico como matéria prima. Portanto, a amônia é o principal insumo para a obtenção dos fertilizantes nitrogenados, e suas unidades produtivas geralmente são instaladas perto das refinarias petroquímicas (CELLA;DE LIMA ROSSI, 2010).

Após o hidrogênio (H) e o carbono (C), o N é o elemento necessário em maiores quantidades pelas plantas: cerca de 1-5% da matéria seca total da planta é constituída por N (HAWKESFORD et al., 2012).

O N possui papel fundamental no metabolismo vegetal, por participar, diretamente, na biossíntese de proteínas e clorofila (ANDRADE et al., 2003), sendo um nutriente requerido em grande quantidade pelo milho (AMADO et al., 2000), com influência em várias características que determinam a produção final (OHLAND et al., 2005). Pode ser aplicado ao solo por diferentes métodos. Os mais usados na cultura de milho são a aplicação a lanço na superfície do solo, incorporação em linhas e aplicação via água de irrigação (fertirrigação) (WIETHÖLTER, 2004; COELHO, 2007).

A absorção de N pelo milho é intensa no período que vai dos 40 dias após a semeadura (elongação, estágio V6-folhas) até o florescimento masculino (emissão do pendão), quando a planta absorve mais de 70 % da sua necessidade total (COELHO, 2007).

O nutriente requerido em maior quantidade pelas gramíneas é o N e, por isso, em muitas situações, é suprido insuficientemente. Em anos em que as condições climáticas são favoráveis à cultura do milho, a quantidade de N requerida para otimizar a produtividade de grãos pode alcançar valores superiores a 150 kg ha⁻¹. Quantidade tão elevada dificilmente será suprida somente pelo solo, havendo necessidade de usar outras fontes suplementares deste nutriente. Dentre estas, destaca-se a utilização, isolada ou combinada, de adubos minerais, leguminosas e esterco (AMADO et al., 2002).

Segundo Raij (1996), a dose de 120 kg ha^{-1} de N é a recomendada para produção estimada de 8.000 a $10.000 \text{ kg ha}^{-1}$ em solos que permitam à planta alta resposta ao N. Semelhantemente, Cruz et al. (2008) concluíram que a utilização de 120 kg ha^{-1} de N permite ao agricultor retorno econômico da adubação nitrogenada, sendo os híbridos mais responsivos que as variedades.

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a redução catalisada pela enzima nitrogenase de N_2 para NH_3 , NH_4^+ , que posteriormente é convertido em nitrogênio orgânico (JAFFE, 1992).

A FBN é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, que são denominados diazotróficos. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associadas às plantas, sendo neste último caso denominadas de diazotróficas associativas (SOUZA MOREIRA et al., 2010).

As características benéficas destas bactérias podem se resumir em: capacidade de penetrar a raiz das plantas, antagonismo a agentes patogênicos, associação com várias gramíneas e com não gramíneas (morango, tabaco, café e outras), produção de hormônios promotores de crescimento. Atuam não só pelo fornecimento de N, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e nas plantas com menor sensibilidade às variações de temperatura e ocorrência em todos os tipos de solo e clima (ARAUJO, 2008).

No Brasil, os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio começaram com leguminosas nos anos 1950, sendo conhecido que nos últimos anos a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* na cultura da soja proporcionou para o Brasil uma grande economia em fertilizantes nitrogenados. De fato, a soja brasileira tornou-se altamente competitiva no mercado mundial por não depender da aplicação de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2005).

A FBN é a melhor fonte de nitrogênio em todos os organismos vivos, na ausência ou presença de fertilizantes industriais. Isso pode ser feito por uma variedade de bactérias e cianobactérias, nas que também podem ser de vida livre.

Uma limitante da FBN é que um processo redutivo, altamente sensível a presença de O_2 , e assim apenas os organismos que vivem em ambientes anaeróbicos ou que podem fornecer um ambiente microaerofílico irão fixar o nitrogênio nos ecossistemas terrestres. As plantas são frequentemente limitadas de nitrogênio, de modo que, do ponto de vista agrícola, compreender a fixação de nitrogênio é importante para otimizar a produção de alimentos por rendimento dos cultivos (JAFFE, 1992).

As bactérias capazes de fixar biologicamente o N_2 possuem uma enzima chamada dinitrogenase, capaz de romper a tripla ligação do N_2 atmosférico e provocar a sua redução até amônia (NH_3). As bactérias se associam a diversas plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas. No caso da soja, bactérias que pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* se associam simbioticamente às plantas, formando estruturas especializadas nas raízes da soja, chamadas nódulos, nos quais ocorre o processo de fixação biológica. Ainda nos nódulos, a amônia sintetizada são incorporados íons hidrogênio (H^+), abundantes nas células das bactérias, levando à transformação de íons amônio (NH_4^+) que serão distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2001).

A atividade da nitrogenase por bactérias tem sido observada na rizosfera de arroz, milho e diferentes gramíneas tropicais, demonstrando que é diferente a resposta na absorção para cada espécie de plantas (DOMMERMUES et al., 1973).

No caso das bactérias endofíticas (ex.: *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella* spp., *Azoarcus* spp.) ou associativas (ex.: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp.), o mesmo complexo da dinitrogenase realiza a conversão do N_2 da atmosfera em amônia. Contudo, ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas (HUNGRIA, 2011).

2.2.1 Inoculantes

Os inoculantes de microrganismos podem ser definidos como formulações

contendo uma ou mais estirpes de microrganismos benéficos (ou espécies) preparadas com um material de suporte fácil de usar e econômico com ação benéfica para o desenvolvimento das plantas (MALUSÁ et al., 2012).

Um inoculante deve conter um meio de cultura específico para as diferentes cepas bacterianas e o crescimento deve ocorrer na temperatura ótima de crescimento bacteriano (25- 35°C), sob agitação, até que a cultura atinja a fase exponencial de crescimento (DÖBEREINER et al., 1995).

Desde a introdução da inoculação artificial, a prática de aplicar inoculante as sementes tem sido o método mais comum. Quando aplicado corretamente, este método garante que cada semente receba a bactéria introduzida. As desvantagens incluem uma limitação da quantidade que pode aderir as superfícies das sementes, contato direto com qualquer produto químico aplicado na semente, o movimento do inoculante para longe da zona da raiz nodulante, pouca proteção contra a dessecação na semente antes do plantio e exposição a estresses ambientais após o plantio. O uso de um adesivo melhora a aderência do inoculante à semente. Os inoculantes aplicados no solo têm as vantagens de ser utilizadas maiores doses do produto (e, portanto, mais inóculo por unidade de área) sendo minimizado o contato direto com sementes tratadas quimicamente (SMITH, 1992).

Os países diferem em suas políticas sobre recomendação de cepas de microrganismos ou Inoculantes comerciais. Em países como os Estados Unidos, cada empresa determina quais microrganismos serão usados em seus produtos. Em outros países, pertencentes ao Mercosul, inoculantes comerciais devem conter as cepas recomendadas pelo comitê de rizobiologistas (HUNGRIA et al., 2005).

2.2.2 Inoculantes na Cultura do Milho

O milho pode ser colonizado por bactérias diazotróficas capazes de reduzir o N atmosférico a amônio em condições naturais, apresentando respostas significativas ao ser inoculado com *Azospirillum*, contribuindo ao aumento de áreas de superfície da raiz (FALLIK et al., 1988; SANTOS et al., 2015).

A. brasilense (Ab-V5 e Ab-V6) tem sido usado amplamente como inoculante comercial no Brasil (FUKAMI et al., 2017), especialmente para as culturas de não leguminosas como milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010; MARKS et al., 2015; FUKAMI et al., 2016).

Hungria et al. (2010) e Longhini et al. (2016) destacam os benefícios da inoculação na cultura do milho com *A. brasilense*, mostrando o aumento do conteúdo de alguns nutrientes nas folhas, como N, P e K, diminuindo a necessidade de fertilizantes químicos e verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes por *A. brasilense* eram o ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas.

Dörr De Quadros et al. (2014) em estudo realizado no desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*, encontraram que as bactérias inoculadas permaneceram em quantidade viável nas raízes até o final do ciclo do milho, demonstrando sobrevivência pós inoculação. Para algumas características agrônômicas, a resposta do milho à inoculação depende do genótipo testado.

Díaz-Zorita et al. (2015) encontraram vários estudos de campo, principalmente na América Latina e na Ásia, que mostraram o aumento de produtividade de culturas inoculadas com *Azospirillum sp.* principalmente em cereais. Revisaram 47 artigos descrevendo 347 casos de respostas de aumento de produção de grãos para a aplicação de diversos inoculantes com *Azospirillum sp.* em 12 países. A maioria dos estudos foram realizadas em culturas de cereais (86,7%), principalmente milho. Entre todas as culturas relatadas, a resposta média de produtividade à inoculação com *Azospirillum sp.* foi de 10,0%, com maiores rendimentos em cereais de inverno (14,0%) do que em cereais de verão (9,5%) ou leguminosas (6,6%).

Hungria et al. (2010), com o uso de produtos inoculantes à base de *Azospirillum spp.*, observaram aumento na produtividade de grãos de milho. Hungria (2011) menciona que os inoculantes são preparados para ter uma concentração mínima de 10^8 células de *Azospirillum g⁻¹* de inoculante turfoso ou mL^{-1} de inoculante líquido. O inoculante turfoso é aplicado na dose de 250 g para 50 kg^{-1} de sementes, e adicionando 300 mL 50 kg^{-1} de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v) para aumentar a adesão do inoculante turfoso nas sementes, estimando um número de 300.000 células semente⁻¹ para o milho. No inoculante líquido, a dose aplicada é de 100 mL 20 kg^{-1} de milho, a estimativa teórica do número de células por semente é de 270.000 células semente⁻¹.

Aplicando uma dose de N de 200 kg ha^{-1} na forma de ureia, associada à inoculação com *A. brasilense*, há aumento do rendimento de grãos de milho, mas o

maior retorno econômico é obtido com N aplicado a 100 kg ha⁻¹ com ureia e inoculação, que pode garantir a rentabilidade da produção de milho irrigado no Cerrado (GALINDO et al., 2017). Em pesquisa efetuada também no Cerrado por Kaneko et al. (2016), concluíram que a inoculação com *A. brasilense* mostrou-se, de modo geral, viável economicamente no cultivo do milho “primeira safra” com ureia na cobertura (90 e 135 kg N ha⁻¹). A determinação da adubação nitrogenada em cobertura deve também estar ligada principalmente às exigências nutricionais da cultura e às propriedades químicas do solo, para que não haja esgotamento do N disponível, o que acarretaria maiores quantidades a serem fornecidas às culturas nas safras posteriores.

A viabilidade de *A. brasilense* foi estudada em dois solos artificiais (BASHAN et al., 1995). *A. brasilense* demonstrou ser um colonizador da rizosfera que sobrevive mal na maioria dos solos por longos períodos de tempo; que fora da rizosfera. Fatores abióticos do solo como: porcentagens de argila, nitrogênio, matéria orgânica, CaCO₃, areia fina e áspera e retenção de água, percolação ou remoção, controlam a sobrevivência desta bactéria.

2.3 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias (algas verde-azuladas) são procariontes oxigênicos fotossintetizantes Gram-negativos com uma longa história evolutiva, sendo provavelmente os organismos fotossintetizantes mais primitivos encontrados na terra e nas regiões polares e alpinas, onde são grandes produtores primários, na cadeia alimentar, captadores de carbono e participam do ciclo de nitrogênio (MARGESIN et al., 2008).

São espécies que variam unicelularmente, tipos coloniais e filamentosas e morfologicamente se assemelham a alguns fósseis que ocorreram 1-3 bilhão anos atrás (STEWART, 1971; GUPTA et al., 2013). Possuem dois tipos de células especializadas chamadas de heterocistos e acinetos. Os heterocistos protegem a enzima nitrogenase do oxigênio, catalizando a conversão do N₂ em amônia, tornando o N disponível e se desenvolvem a partir de células vegetativas. Os acinetos são células resistentes a condições ambientais desfavoráveis. Sua função pode ser comparada a de esporos de bactérias e o seu protoplasma acumula grande quantidade de reserva de nutrientes (FLEMING; HASELKORN, 1973). A sua reprodução

é assexuada e ocorre ou por divisão da célula, fracionamento de colônias, formação de hormogônias ou acinetos (BARSANTI;GUALTIERI, 2014).

As cianobactérias têm atraído o interesse para a produção de energia sustentável. Por se tratarem de organismos fotoautotróficas aquáticas, elas podem ser produzidas em terras não aráveis e não competem por terras para produção de alimentos. Seus ricos recursos genéticos oferecem meios como condutor de vias metabólicas para a síntese de base biológica valiosa para vários produtos (ROSGAARD et al., 2012).

As cianobactérias podem ser utilizadas como alimentos, rações, combustíveis, fertilizantes, corantes, produção de vários metabólitos, incluindo vitaminas, enzimas, medicamentos e sondas farmacológicas, aumentando os seus usos dia a dia. O solo é o habitat de algumas espécies de cianobactérias terrestres que são benéficas para a fertilidade do solo, fixando nitrogênio atmosférico (N), ajudando na estruturação do solo, a manter a umidade e evitando a erosão (SHARIATMADARI et al., 2013).

Na agricultura, existe potencial do uso da sua biomassa como condicionador do solo e/ou fertilizante. Além disso, existe o efeito ainda pouco estudado sobre o crescimento de plantas, que pode ocorrer decorrente de substâncias que estimulam este crescimento ou até mesmo a FBN. Explorar esses potenciais abre possibilidades de estudos relacionados à inoculação de cianobactérias com capacidade de fornecer nitrogênio para culturas de interesse econômico, como plantas das famílias Poaceae (gramíneas), como trigo (*Triticum sativum*) e milho (*Zea mays* L.), e Fabaceae (leguminosas), como amendoim (*Arachis hypogaea* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* L.), ou ainda, a coinoculação das mesmas com outras bactérias fixadoras de N, para aumentar o suprimento desse nutriente às plantas (ANDRADE;COLOZZI FILHO, 2014).

2.3.1 Taxonomia de Cianobactérias

A taxonomia das cianobactérias é desenvolvida na botânica porque são organismos morfológicamente visíveis, com aspecto similar às algas e tradicionalmente foram identificados como tais. Por conseguinte, a sua nomenclatura foi coberta pelas disposições do código botânico da nomenclatura, atualmente o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas, ICN, (incluindo

versões anteriores, conhecido como Código Internacional de Nomenclatura Botânica, ICBN) (OREN; VENTURA, 2017).

Em tamanho, as cianobactérias variam de células subsféricas com menos de 1 µm de diâmetro para tricomas com mais de 100 µm de diâmetro. Algumas espécies são capazes de diferenciar por vários tipos de células, e as formas que combinam esses vários tipos de células com vários padrões de ramificação são morfologicamente as procariotas mais complexas conhecidas (WHITTON, 1992).

Em vista da diversidade morfológica das cianobactérias, uma questão óbvia é a medida em que isso é acompanhado pela diversidade fisiológica, bioquímica e molecular. A maioria dos estudos experimentais se concentrou em um número limitado de gêneros e espécies, e relativamente poucos estudos estabeleceram deliberadamente para investigar a diversidade nesses outros níveis organizacionais. Enquanto a maioria dos fisiologistas e bioquímicos percebem esse problema em teoria, na prática, aparecem frequentemente na literatura que não levam em conta os organismos menos estudados (WHITTON, 1992).

2.3.1.1 *Nostoc muscorum*

Nostoc é um gênero de cianobactérias da ordem *Nostocales* e família *Nostocaceae*, que podem formar colônias macroscópicas ou microscópicas e é comum nos habitats terrestres e aquáticos. Grande parte do sucesso do *Nostoc* em habitats terrestres está relacionado à sua capacidade de permanecer dessecada por meses ou anos e recuperar completamente a atividade metabólica dentro de horas a dias após a reidratação. *Nostoc* também pode suportar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento e, portanto, é um componente importante de habitats terrestres extremos no Ártico e Antártico. A capacidade de fixar N atmosférico pode proporcionar uma vantagem em ambientes pobres em nitrogênio (DODDS et al., 1995).

Nostoc muscorum é um microrganismo de vida livre com células filamentosas, Gram-negativas (ALLISON et al., 1937). A diferenciação de 5-10% das células é observada quando os filamentos são transferidos a partir de um recipiente de meio contendo NH_4Cl ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a um meio isento de N. As células diferenciadas, chamadas heterocistos, podem ser observadas em intervalos regulares ao longo do comprimento do filamento 24 horas após a transferência (FLEMING; HASELKORN, 1973).

O ambiente ideal para *N. muscorum* é um pH na faixa de 7,0 a 8,5, com um limite inferior de pH de 5,7. Cresce melhor quando a intensidade da luz é menor do que a luz solar direta, mas pode continuar a crescer e fixar nitrogênio na presença de glicose e ausência de luz solar (ALLISON et al., 1937).

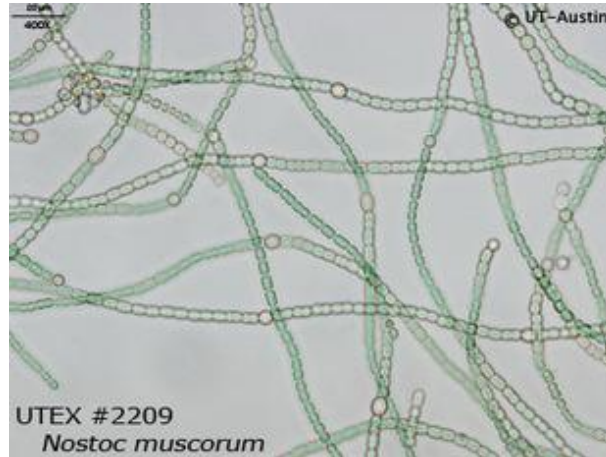


Figura 2.2 – Cianobactéria *Nostoc muscorum* (<https://utex.org/products/utex-2209>).

2.3.1.2 Anabaena

Anabaena é um gênero de cianobactérias da ordem *Nostocales* e família *Nostocaceae*, fotoautotróficas de reprodução assexuada, comumente encontradas em água doce, formadoras de heterocistos e realizam fotossíntese oxigênica. *Anabaena* cresce em filamentos longos de células vegetativas (STARR et al., 2013).

Algumas cianobactérias do gênero *Anabaena* são produtoras de pigmentos de interesse comercial, biofertilizantes e polissacarídeos (LORETO et al., 2003).

Anabaena cylindrica, além de contribuir na FBN, tem atividade na solubilidade do ferro por produzir sideróforos (ITOU et al., 2001). Outro uso muito importante é para biocombustíveis como a produção de hidrogênio (BENEMANN;WEARE, 1974) e biomassa para biodiesel (PATEL et al., 2017).

A diferenciação celular em *Anabaena cylindrica* é acompanhada de alterações características na composição de pigmentos de heterocistos e esporos (FAY, 1969).



Figura 2.3 – Cianobactéria *Anabaena cylindrica* (<https://utex.org/products/utex-b-0629>).

2.3.1.3 *Calothrix brevissima*

Calothrix brevissima, da orden *Nostocales* e família *Rivulariaceae*, é uma cianobactéria filamentosa, com até 60 μm de comprimento. As suas células possuem de 4-5 μm de largura, estritamente constrangidas nas paredes cruzadas. A sua cor é verde oliva, com célula apical arredondada e heterocisto basal hemisférico a esférico (FONSECA;RODRIGUES, 2005; BARSANTI;GUALTIERI, 2014).

Quando cultivada em meio sem nitrogênio, *Calothrix brevissima* West forma um heterocisto basal seguido de um filamento de células de tamanho decrescente. Num meio com nitrato, a alga não forma heterocistos, mas a polaridade parcial, isto é, o afunilamento dos filamentos permanece. Em contraste, a polaridade, bem como a diferenciação de heterocistos, é perdida no crescimento em meio com amônio e a formação frequente de ramos falsos é observada (RAI et al., 1978).

Calothrix sp. é uma das cianobactérias dominantes dos campos de arroz das zonas úmidas, enriquecendo o solo com carbono e nitrogênio, assim também na solubilização de fosfatos e contribuindo na melhoria da agregação do solo (HABIB et al., 2011).

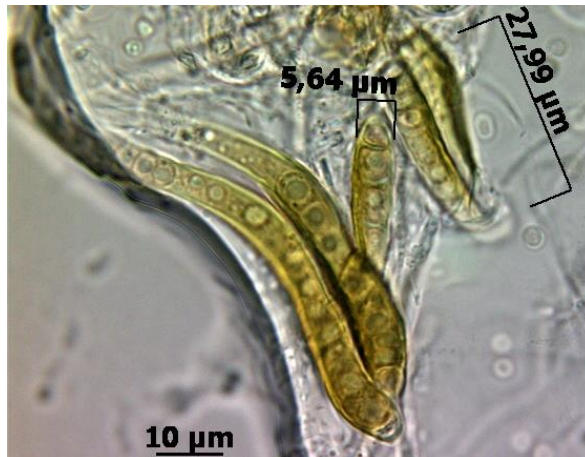


Figura 2.4 – Cianobactéria *Calothrix brevissima*

(http://www.kpabg.ru/cyanopro/sites/default/files/Calothrix_brevissima_1.JPG).

2.3.2 Cultivo de Cianobactérias

Para que uma cultura de microrganismos seja bem-sucedida, existem vários fatores ambientais e operacionais que afetam a biologia e habitat, e devem ser levadas em consideração. Esses fatores também afetam a produtividade de biomassa das cianobactérias, bem como a sua composição. Os fatores mais importantes são: nutrientes, pH, luz, densidade celular, temperatura e contaminação por outros microrganismos (MARKOU;GEORGAKAKIS, 2011).

As cianobactérias apresentam uma ampla diversidade de formas devido às adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas adquiridas ao longo de sua história evolutiva. A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das características marcantes das cianobactérias. Entretanto, ambientes de água doce são os mais favoráveis para o seu crescimento. A maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas com valores de pH na faixa de 6 a 9, temperatura entre 15 a 30°C, ventos fracos e moderados e alta concentração de nutrientes. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz, obtendo energia, principalmente, por meio da fotossíntese (BARBOSA, 2009).

As cianobactérias têm três tipos de metabolismo, quanto ao uso de carbono para a síntese de biomassa (BARBOSA, 2009): Fotoautotróficos obrigatórios: crescem apenas na presença de luz em meio inorgânico e não são capazes de assimilar C orgânico (HUANG et al., 2010). Quimioheterotróficos facultativos: vivem em ambiente sem luz em meio contendo fonte de C orgânico (maltose, glicose, sacarose, lactose,

glicerol e amido) ou fototroficamente na luz. Fotoheterotróficos facultativos: utilizam compostos orgânicos como fonte de C na luz mas não no escuro ou fototroficamente na luz (ZHANG et al., 2011; MOON et al., 2013).

As cianobactérias requerem concentrações mínimas de nutrientes (N, P, S, K, Fe, etc.), os quais constituem os diferentes meios de cultura sintéticos específicos para o seu desenvolvimento, sendo os mais usados mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Meios de cultura sintéticos BG-11, Zarrouk's médium e High Salt Medium, para crescimento e manutenção de cianobactérias.

Reagentes	(STANIER et al., 1971)	(ZARROUK, 1966)	(SUEOKA, 1960)
	BG-11	Zarrouk's medium	High Salt Medium
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,04	0,50	1,44
MgSO ₄ 7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,075	0,20	0,02
CaCl ₂ 2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,036	0,40	0,01
C ₆ H ₈ O ₇ (g L ⁻¹)	0,006	-	-
C ₆ H ₅₊₄ YFexNyO ₇ (g L ⁻¹)	0,006	-	-
EDTA (g L ⁻¹)	0,001	0,08	-
Na ₂ CO ₃ (g L ⁻¹)	0,02	-	-
Trace metal mix (mL ⁻¹)	1,00	-	-
NaHCO ₃ (g L ⁻¹)	-	16,8	-
NaNO ₃ (g L ⁻¹)	1,5	2,50	-
K ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	-	1,00	-
NaCl (g L ⁻¹)	-	1,00	-
FeSO ₄ 7H ₂ O (g L ⁻¹)	-	0,01	-
Solução A5 mL	-	1,00	-
Solução B6 mL	-	1,00	-
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	-	-	0,72
NH ₄ Cl (g L ⁻¹)	-	-	0,50

Solução A5 (g L⁻¹): 2,86x10⁻³ H₃BO₃; 1,81x10⁻³ MnCl₂ 4H₂O; 0,22 ZnSO₄ 7H₂O; 0,39 Na₂MoO₄ 2H₂O; 0,079 CuSO₄ 5H₂O. Solução B6 (mg L⁻¹): 22,86 NH₄VO₃; 192 KCr (SO₄)₂ 12H₂O; 44,8 NiSO₄ 6H₂O; 17,94 Na₂WO₄ 2H₂O; 61,1 TiOSO₂ 8H₂O; 43,98 Co(NO₃)₂ 6H₂O.

Fonte: o próprio autor.

2.3.3 Fixação Biológica do Nitrogênio em Cianobactérias

As cianobactérias são os organismos fotossintetizantes mais abundantes na terra, desempenhando papéis essenciais na renovação do oxigênio atmosférico e na

produção de nitrogênio biologicamente disponível, tanto em vida livre quanto como em simbioses (MURO-PASTOR et al., 2017).

As cianobactérias com competência simbiótica são encontradas principalmente no gênero *Nostoc*, que é comum em ambientes terrestres, embora alguns outros cianobionetas heterocíclicos (cianobactérias simbióticas), como *Calothrix* e *Scytonema* (em líquenes e cícadas) e *Richelia* (em diatomáceas), também formem simbioses (BERGMAN et al., 2007).

As cianobactérias têm uma ampla distribuição ecológica que varia de desertos a todos os tipos de reservatórios de água, sugerindo mecanismos de adaptação sofisticados. As filamentosas são procariotos complexos que apresentam uma variedade de processos de diferenciação celular, incluindo a formação de células semelhantes a esporos, hormogonia móvel ou heterocistos fixadores de nitrogênio. As cianobactérias heterocísticas são organismos fotossintetizantes filamentosos que crescem como cordões de células fotossintéticas indiferenciadas (chamadas vegetativas) ou, por deficiência de nitrogênio, como filamentos contendo células vegetativas e heterocistos, este último especializado na fixação do nitrogênio atmosférico (MURO-PASTOR et al., 2017).

A fixação de N_2 é realizada exclusivamente por procariotas (Bactérias ou Archaea) em um ambiente anóxico ou em condições microóxicas intracelulares que são apropriados para a expressão e função da enzima da fixação do N_2 , a nitrogenase. Esta enzima é codificada pelo operon *nifHDK* e é extremamente sensível ao oxigênio. Em um filamento cianobacteriano fotossintético, o heterocisto fornece um local microóxico para a fixação do N_2 . Portanto, nestes organismos, a compartimentalização da fotossíntese oxigênica e a fixação do N_2 em diferentes tipos de células é a solução para o problema da incompatibilidade entre os dois processos (FLORES;HERRERO, 2010).

2.3.4 Uso de Cianobactérias na Cultura de Milho

Jäger et al. (2010) fizeram o primeiro relato sobre o efeito de microalgas e cianobactérias em anteras na cultura de milho (*Zea mays* L.). Suas pesquisas foram sobre a atividade da citocinina e auxina, melhorando a resposta androgênica e foi capaz de reduzir a quantidade de auxina sintética de ácido 2,4 diclorofenoxy-acético (2,4-D) necessários, ou substituí-lo completamente.

Uma pesquisa efetuada na África do Sul foi realizada para avaliar os efeitos da inoculação de uma cepa da cianobactéria *Nostoc* na estrutura e fertilidade do solo, e o crescimento do milho. A suspensão *Nostoc* foi aplicada uniformemente sobre solos em vasos a uma taxa de 6 g (peso seco) por metro quadrado logo após a germinação do milho. A inoculação com *Nostoc* aumentou o teor de N no solo de 17% a 40%. O teor de carbono também aumentou significativamente. A inoculação com *Nostoc* aumentou a produção de matéria seca do milho em 40% e 49%. Os aumentos correspondentes em teor de N no tecido de milho foram entre 14% e 23% (MAQUBELA et al., 2009).

Cianobactérias fixadoras de nitrogênio também foram reportadas nas culturas de cana e milho na Índia (THAJUDDIN; SUBRAMANIAN, 2005).

Três espécies de algas marinhas vermelhas *Laurencia obtusa*, *Corallina elongata* e *Jania rubens* foram estudadas quanto ao seu efeito como biofertilizante no crescimento de plantas de milho. *Laurencia obtusa* + *Jania rubens* foi o melhor tratamento para aumentar o crescimento de plantas de milho durante as primeiras fases da cultura, sendo que o melhor crescimento da parte aérea das plantas aumentou em 48,21% após 60 dias de plantio (SAINAZ; RAGAA, 2013).

No Egito, uma pesquisa com as cianobactérias *Nostoc muscorum* e *N. rivulare* indicou que a atividade da nitrogenase de *Nostoc* foi significativamente aumentada em comparação com o sistema radicular do milho não inoculado (SHOLKAMY et al., 2012).

Com o objetivo de avaliar a influência da inoculação de cianobactérias da coleção IPR do IAPAR no desenvolvimento de plantas de milho, foi conduzido um experimento no Instituto Agrônomo Paraná, realizado em casa de vegetação, com solo eséril durante 35 dias. As sementes de milho usadas foram do cultivar *IPR 164*, embebidas em suspensão de cada uma das cianobactérias, que foram crescidas no meio BG-11, usando como controle sementes embebidas em meio de cultura. Avaliaram-se altura de plantas, comprimento das raízes, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, e teores de nitrogênio da parte aérea. Houve aumento na massa seca da raiz, promovido pela inoculação da cianobactéria *IPR7029* em relação ao controle e as inoculadas com *IPRSyn7062*. Apesar das espécies de cianobactérias mostrarem capacidade de realizar FBN *in vitro*, não foi observado o efeito significativo da inoculação na concentração de N da parte aérea. Nas outras avaliações, com exceção da massa seca de raiz em solo natural, não

houve diferenças significativas entre os tratamentos (ANDRADE;COLOZZI FILHO, 2014).

Maqubela et al. (2009) afirmam que a inoculação de cianobactérias em milho resulta em maior crescimento das plantas, melhorando a absorção de nitrogênio. Prasanna et al. (2016) encontraram diferenças significativas na altura de plantas, maiores que o controle, quando inoculadas com cianobactérias. Já na avaliação do rendimento de grãos de milho, não encontraram diferenças significativas em relação ao tratamento controle, com rendimento entre 6,45 e 6,88 g por planta.

Embora estes trabalhos mostrem efeito positivo das cianobactérias, ainda falta informação sobre o efeito benéfico da inoculação das cianobactérias nas condições do Brasil e a interação com novos genótipos de milho e com o *Azospirillum* sp.

3 ARTIGO A

CIANOBACTÉRIAS: CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTIVO E INOCULAÇÃO EM SEMENTES MILHO

3.1 RESUMO

As cianobactérias podem fixar o nitrogênio atmosférico para formas disponíveis para as plantas, com potencial uso como inoculantes. Este trabalho teve como objetivos avaliar a taxa de crescimento da *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima*, em meio BG11 modificado, e o efeito de suas inoculações em sementes de milho. O trabalho foi dividido em quatro ensaios realizados em câmara de crescimento (1 e 2) e casa de vegetação (3 e 4): (1) crescimento de cianobactérias em meio BG11 modificado, (2) cianobactérias na germinação e desenvolvimento inicial do milho, (3) características fitométricas do milho com e sem adubação nitrogenada e inoculado com cianobactérias, (4) coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho. No ensaio 1, a cianobactéria *Anabaena* sp., cultivada em meio de cultura BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, destacou-se na produção de biomassa seca, e teores de clorofila, carotenóides e nitrogênio. No ensaio 2, *A. cylindrica*, *C. brevissima* e *N. muscorum* no meio BG11 sem N, e em meio suplementado somente para *A. cylindrica* proporcionaram maior altura de plântulas de milho. O maior diâmetro do pseudocaule e teor de clorofila total foram maiores para inoculação de *A. cylindrica* em meio suplementado. A massa fresca da raiz foi maior para *N. muscorum* em meio BG11 sem N. Na massa seca da raiz obteve-se maior resposta com *A. cylindrica* em meio BG11 sem N. Para volume da raiz efeitos positivos foram obtidos para *A. cylindrica* e *N. muscorum* em meio de cultura BG11 sem N, e para *A. cylindrica* em meio suplementado. No ensaio 3, houve aumentos do diâmetro do colmo para as quatro cianobactérias utilizadas e na massa foliar para *N. muscorum*. No ensaio 4, as cianobactérias associadas com *Azospirillum brasilense* apresentaram alto potencial para favorecer a cultura do milho pelo aumento da massa e volume radicular, e massa e área foliar. A coinoculação com *A. cylindrica* e com *A. brasilense* apresentaram as maiores respostas, comprovando o potencial de uso desses microrganismos em aumentar o crescimento de plantas de milho, independentemente do genótipo utilizado.

Palavras-chave: *Nostoc muscorum*. *Anabaena* sp.. *Anabaena cylindrica*. *Calothrix brevissima*. *Zea mays*. Promoção de crescimento vegetal.

CYANOBACTERIA: GROWTH IN CULTURE MEDIUM AND INOCULATION IN SEED MAIZE

3.2 ABSTRACT

Cyanobacteria can fix atmospheric nitrogen to forms available to plants with potential use as inoculants. The objective of this work was to evaluate the growth rate of *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* and *Calothrix brevissima*, in modified BG11 medium, and the effect of inoculations on maize seeds. The work was divided in four experiments in a growth chamber (1 and 2) and greenhouse (3 and 4): (1) growth of cyanobacteria in modified BG11 medium, (2) effect of cyanobacteria on germination and initial development of maize, (3) phytometric characteristics of maize with and without nitrogen fertilization and inoculated with cyanobacteria, (4) cyanobacterial co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in maize genotypes. In assay 1, the cyanobacteria *Anabaena* sp., cultivated in BG11 medium without N supplemented with yeast extract, stood out in the production of dry biomass, and contents of chlorophyll, carotenoids and nitrogen. In assay 2, the best effect of cyanobacteria at the time of maize seedlings at 14 days was obtained for *A. cylindrica*, *C. brevissima* and *N. muscorum* in BG11 medium without N, and in medium supplemented only for *A. cylindrica*. The largest diameter of pseudostem and total chlorophyll was higher for *A. cylindrica* in supplemented medium. The fresh root mass was higher for *N. muscorum* in BG11 medium without N. Concerning the dry root mass, a greater response was obtained in *A. cylindrica* in BG11 medium without N. For root volume, positive effects were obtained for *A. cylindrica* and *N. muscorum* in BG11 culture medium without N, and to *A. cylindrica* in supplemented medium. In assay 3, positive effects on stem diameter were found for the four cyanobacteria and in the foliar mass for *N. muscorum*. In assay 4, the cyanobacteria associated with *Azospirillum brasilense* presented a high potential to favor the maize crop, due to the increase in mass and root volume, and mass and leaf area. The co-inoculation between *A. cylindrica* and *A. brasilense* resulted in better responses, proving the potential of using these microorganisms for development of corn crop, regardless of the genotype.

Keywords: *Nostoc muscorum*. *Anabaena* sp.. *Anabaena cylindrica*. *Calothrix brevissima*. *Zea mays*. Plant growth promotion.

3.3 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são procariotos que pertencem ao grupo mais antigo de organismos fotossintetizantes e são os únicos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (STEWART, 1971; FLORES;HERRERO, 2010). O filo das cianobactérias inclui cerca de 2000 espécies de 150 gêneros e 5 ordens, que variam muito em formas e tamanhos, prosperando em uma ampla gama de habitats, de ecossistemas aquáticos, incluindo água doce e marinha, e ecossistemas terrestres (DUCHOUD et al., 2017).

Esses microrganismos ganharam atenção nos últimos anos devido as suas diversas aplicações na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, na aquicultura, no tratamento de águas residuais, no uso como fertilizantes, na produção de metabólitos, vitaminas, toxinas, enzimas, produtos farmacêuticos e biocombustíveis, apresentando grande importância econômica (ABED et al., 2009).

As cianobactérias heterocísticas são organismos que formam filamentos indiferenciados de células fotossintetizantes (chamadas vegetativas). Em condições de deficiência de nitrogênio apresentam filamentos contendo células vegetativas e heterocistos, este último especializado na fixação do nitrogênio atmosférico (MURO-PASTOR et al., 2017). Cianobactérias como *Nostoc*, *Tolypothrix*, *Anabaena* e *Aulosira* têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e melhorar a fertilidade do solo (SAHU et al., 2012).

Efeitos benéficos da inoculação com cianobactérias foram reportados em culturas como cevada, aveia, tomate, rabanete, algodão, cana, milho, pimentão e alface. Estimativas *in situ* usando a técnica de redução de acetileno mostraram adição ao solo de 15 - 18 kg ha⁻¹ ano de nitrogênio (N) devido à atividade de cianobactérias diazotróficas (THAJUDDIN;SUBRAMANIAN, 2005).

O milho é o cereal mais produzido no mundo, cuja produtividade está diretamente relacionada a sua nutrição nitrogenada, sendo N um dos nutrientes requeridos em maior quantidade pela cultura (LADHA et al., 2016). A FBN realizada por cianobactérias é uma alternativa para fornecimento parcial de N para a cultura, com redução dos custos tanto econômicos como ambientais. Entretanto, o crescimento das cianobactérias em meio de cultura suplementado com fonte de carbono ou vitaminas, para a sua rápida multiplicação tem sido pouco estudado.

Assim, como a sua aplicação como inoculante em sementes de milho, para o desenvolvimento inicial de plântulas e plantas, com e sem adubação nitrogenada e a coinoculação com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a taxa de crescimento da *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima*, em meio BG11 modificado e o efeito de sua inoculação e coinoculação com *Azospirillum brasilense* em sementes de milho.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos, em câmara de crescimento e em casa de vegetação no Instituto Agrônomo Paraná – IAPAR, localizado no município de Londrina (PR), coordenadas geográficas 23°23' S e 51° 11' W, altitude média 566 m, no período de novembro de 2016 a janeiro de 2017.

3.4.1 Obtenção e manutenção das Cianobactérias

As cianobactérias foram obtidas do Banco de Cultivos do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, sendo estas: *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica*, e *Calothrix brevissima*.

Para manutenção e crescimento das cianobactérias foi usado o meio de cultura BG11 (STANIER et al., 1971), sem nitrogênio, 0,04 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,075 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 0,036 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O; 0,006 g L⁻¹ ácido cítrico; 0,006 g L⁻¹ citrato férrico de amônio; 0,001 g L⁻¹ EDTA; 0,02 g L⁻¹ Na₂CO₃; 1 ml L⁻¹ trace metal mix, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h, temperatura controlada de 30,0 ± 2,0°C na fase luminosa, e 22,0 ± 2,0°C na fase escura.

A densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR – photosynthetically active radiation*) foi de 100 ± 20 µE m⁻² s⁻¹, medida por porômetro Licor (INC modelo LI-1600), fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares, dispostas paralelamente na parte superior dos recipientes.

3.4.2 Ensaio 1: Crescimento de cianobactérias em meio BG11 modificado

3.4.2.1. Preparo e caracterização dos inóculos

Os inóculos de cianobactérias foram preparados a partir de 10 g L⁻¹ de células frescas de cada espécie obtidas por centrifugação a 6.000 rpm e colocadas em meio BG11 (STANIER et al., 1971) esterilizado sem N a pH 7,0. Na tabela 3.1 são apresentadas as principais características dos inóculos.

Tabela 3.1 Caracterização de biomassa úmida, massa seca, unidades formadoras de colônias (UFC), clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c* e carotenóides de quatro cianobactérias utilizadas como inoculantes.

Cianobactéria	Biomassa (g L ⁻¹)		UFC mL ⁻¹	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>c</i>	Carotenóides µg L ⁻¹
	úmida	seca					
<i>Nostoc muscorum</i>	10	0,15	1x10 ¹⁰	1,99	2,45	5,60	2,84
<i>Anabaena sp.</i>	10	0,24	1x10 ¹⁴	2,74	2,22	5,56	3,34
<i>Anabaena cylindrica</i>	10	0,24	1x10 ¹⁴	2,95	0,87	4,56	1,74
<i>Calhotrix brevissima</i>	10	0,10	1x10 ¹³	0,83	8,50	11,07	4,84

Fonte: o próprio autor.

3.4.2.2. Crescimento das cianobactérias

Para determinação do crescimento das cianobactérias foram usados dois meios de cultura, BG11 (STANIER et al. 1971) sem N e BG 11 sem N suplementado com extrato de levedura Sigma ® P.A. a 4,0 g L⁻¹.

O experimento foi conduzido em frascos de vidro, com capacidade de 125 mL, nos quais foram colocados os meios de cultura inoculando com 10% (v/v) de cada uma das quatro espécies de cianobactérias. A incubação foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente.

Foram testados oito tratamentos, correspondentes a dois meios de cultura (BG11 sem N e BG11 sem N e suplementado com extrato de levedura a 4 g L⁻¹), com quatro espécies de cianobactérias (*N. muscorum*, *Anabaena sp.*, *A. cylindrica*, e *C. brevissima*), com duas repetições, em seis épocas de avaliação. As avaliações foram efetuadas a cada cinco dias, durante 30 dias, coletando-se 16 frascos a cada vez. Totalizando-se 96 frascos.

A curva de crescimento foi caracterizada pela determinação da biomassa seca (g L^{-1}) em uma alíquota de 40 mL, centrifugando-se a $4000 \times g$ (marca Z383 HERMLE K) durante 10 min a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. O sedimento foi seco até massa constante a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (KONG et al., 2013).

Para a determinação da clorofila (a) e carotenóides foi utilizada uma alíquota da suspensão celular de 20 mL. Para a extração, adicionaram-se 10 mL de acetona 90% à amostra, deixando-a 24 h sob refrigeração e no escuro. Após as amostras foram centrifugadas a 4.000 rotações/minuto, durante 15 minutos. Na sequência, procedeu-se a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro (UV Genesys 10), nos comprimentos de onda de 750, 664, 647, 480 e 510 nm, pelo método de Jeffrey;Humphrey (1975) para clorofila a e Strickland;Parsons (1972) para carotenoides, com as seguinte equações:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [(A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) - (A_{664a \text{ nm}} - A_{750a \text{ nm}})] \times v/(V \times c)$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/L}) = [7,6 \times A_{480 \text{ nm}} - (3,0 \times A_{750 \text{ nm}}) - 1,49 \times A_{510 \text{ nm}} - 2,0 \times A_{750 \text{ nm}}] \times v/(V \times c)$$

Nas quais, **A** é absorbância do comprimento de onda, **V** é a espessura da cubeta, **v** é o volume de extração e **c** o volume de filtrado (suspensão celular).

A quantidade de N no meio de cultivo para cada espécie foi determinada na forma de amônia (KEENEY;NELSON, 1982) pelo método colorimétrico (MIYAZAWA, 1992). Alíquotas de 20 mL dos cultivos foram acondicionadas em tubos de ensaio e acrescidas de 0,5 mL do catalisador sulfato de cobre com sulfato de potássio, na proporção de 1:10. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e os tubos foram submetidos à agitação seguida de incubação a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ em bloco digestor até que as amostras fossem reduzidas a 2 mL. Após a redução, a temperatura foi aumentada gradativamente até alcançar $350 \text{ }^\circ\text{C}$ e as amostras apresentarem coloração verde claro.

As amostras digeridas foram transferidas para novos tubos e diluídas em 15 mL de água deionizada. O pH das amostras foi ajustado entre 3 e 4 com NaOH ou HCl e, em seguida, as amostras tiveram seu volume completado com água deionizada para um volume final de 30 mL.

A curva padrão de N foi confeccionada, utilizando-se uma solução de NH_4^+ nas concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 mg L^{-1} de N. A solução foi preparada

utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ PA, previamente seco em estufa a 105 °C e diluído em água deionizada. Em um novo tubo foi pipetado 1 mL da solução padrão ou da amostra, 6 mL de água deionizada, 1 mL da solução de ácido salicílico 5%, 1 mL de solução de nitroprussiato de sódio 0,1% e 1 mL de solução de NaOCl 0,15%. As amostras foram homogeneizadas e realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 697 nm. Com a equação da curva da solução padrão de NH_4^+ foi possível calcular a concentração de N fixado pelas cianobactérias.

O potencial de FBN das espécies de cianobactérias foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$N_{\text{fix}} = A - B$$

Onde; A corresponde ao N total nos 20 mL de meio incubado com uma dada cianobactéria e B o teor correspondente no mesmo volume de meio não cultivado com a cianobactéria.

3.4.3 Ensaio 2: Cianobactérias na germinação e desenvolvimento inicial do milho

Para avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de milho foi utilizado o híbrido simples DOW 2B587, de ciclo precoce.

Foram empregados 10 tratamentos com quatro repetições, correspondendo a dois meios de cultura (BG11 sem N e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura) com as quatro espécies de cianobactérias (*N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, e *C. brevissima*), na concentração de 10^8 UFC mL^{-1} , além de dois tratamentos adicionais (controle) com *Azospirillum brasilense* (Azototal® estirpes AbV5 e AbV6 com $2,0 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) e sem inoculação (água destilada).

Para o teste de germinação, em cada tratamento foram usadas 100 sementes, em papel toalha umedecido na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato seco. As sementes foram inoculadas previamente com os microrganismos segundo os tratamentos pré-estabelecidos. A dose aplicada do inoculante foi de 5 mL kg^{-1} de sementes, com estimativas teóricas de 270.000 células por semente (HUNGRIA et al., 2010). A inoculação consistiu em se colocar as sementes e o produto em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante sobre as sementes.

Os rolos de papel foram acondicionados em sacos plásticos e colocados em câmara de germinação BOD (Biochemical Oxygen Demand) sob temperatura de 28 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, com quatro repetições. A avaliação foi realizada no sétimo dia, contabilizando-se a porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

Para a avaliação do desenvolvimento de plântulas de milho, sementes do híbrido DOW 2B587 foram desinfestadas por imersão em etanol a 70% durante 3 min e depois em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 15 min, cuidadosamente lavando-as 10 vezes com água destilada estéril, e colocadas em papel de germinação e mantidas em câmara de germinação por cinco dias, sob temperatura de 28 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

As sementes germinadas após cinco dias foram colocadas em frascos de vidro de 600 mL, contendo solução nutritiva sem nitrogênio (SOMASEGARAN; HOBEN, 2012) e papel absorvente poroso como suporte para as plantas (ANDRADE et al., 1994). Em seguida, as sementes foram inoculadas de acordo com os tratamentos, sendo utilizado 1 mL de meio de modo a fornecer 10^8 UFC/semente germinada, usando *Azospirillum brasilense* (Azototal ® $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e água destilada como tratamentos controle.

Os vasos foram incubados em câmara de crescimento sob condições controladas: 16 h de luz a 25 ° C / 60% de UR e 8 h de escuro a 18 ° C / 40% de UR durante 14 dias, com intensidade de luz 11500 Lux ≈ 155 μ E / m² seg.

Aos 14 dias após a inoculação foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento: comprimento da parte aérea e das raízes com auxílio de régua milimetrada (cm plântula); diâmetro do pseudocaule (mm plântula) com paquímetro digital; massa fresca e seca das raízes (g plântula). Após a pesagem, as raízes frescas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secar em estufa com circulação forçada de ar (60 ± 2 °C) por 72 h, obtendo-se a biomassa seca com precisão de 0,01 g; volume das raízes, colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo um volume conhecido de água. Pela diferença, obteve-se o volume de raízes por planta, pela equivalência de unidades (1 ml = 1 cm³) (KAPPES et al., 2010). Para o conteúdo de clorofila e carotenóides da parte aérea (mg g⁻¹), amostras de 0,2 g de tecido foliar fresco foram preparadas e os extratos centrifugados, sendo efetuadas leituras em espectrofotômetro (663, 645 e 434 nm para clorofila total e

carotenóides) baseada na metodologia de Witham et al. (1971) e Meschede et al. (2011).

3.4.4 Ensaio 3: Características fitométricas do milho com e sem adubação nitrogenada e inoculado com cianobactérias

Utilizou-se amostra da camada 0,00 - 0,20 m, na Estação experimental do IAPAR, em Londrina Paraná, de um solo muito argiloso (810 g kg⁻¹ de argila) classificado como Latossolo Vermelho distroférico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2013). As amostras foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de malha 4 mm e acondicionadas em vasos plásticos de 8 kg. As características físico-químicas eram: pH (CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹) 4,55; 6,94 cmol_c dm⁻³ de H⁺ + Al³⁺; 2,91 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺; 1,27 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺; 0,32 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 11,44 cmol_c dm⁻³ de CTC; 39,33% de saturação por bases; 3,93 mg dm⁻³ de P (Mehlich-1); 17,78 g dm⁻³ de C; 81%, 13% e 6%, respectivamente, argila, silte e areia.

A cultivar de milho usada foi a variedade IPR164, ciclo precoce, indicado para cultivo no verão e safrinha, porte médio de 2,30 m.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, em arranjo fatorial 2x6. Foram avaliados dois níveis de adubação nitrogenada de cobertura (equivalentes a 0 e 60 kg N ha⁻¹), combinados com seis tratamentos de inoculação, sendo quatro de cianobactérias (10⁸ UFC mL⁻¹ por espécie) *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, e *C. brevissima*, um tratamento controle sem inoculação e outro com *A. brasilense*, este último utilizando um inoculante líquido comercial (Azototal® estirpes AbV5 e AbV6 com 2,0x10⁸ UFC mL⁻¹).

As sementes foram inoculadas momentos antes da semeadura com 5 mL de inoculante para 1 kg de semente. A inoculação consistiu em se colocar as sementes e o produto em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante sobre as mesmas.

Foram semeadas manualmente cinco sementes por vaso na profundidade de 2 cm, deixando-se apenas uma planta aos 10 dias da emergência. A adubação nitrogenada (ureia 46%) na semeadura foi de 20 kg de N ha⁻¹ para todos os tratamentos. Para os tratamentos com adubação nitrogenada de cobertura

aplicaram-se 60 kg N ha⁻¹ aos 35 dias após a emergência das plântulas (estádio V6), utilizando-se ureia. A adubação de base foi constituída pela aplicação das fontes superfosfato triplo (120 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e cloreto de potássio (50 kg ha⁻¹ de K₂O).

As avaliações fitométricas foram realizadas avaliando o índice de área foliar aos 63 dias (estádio VT), segundo a metodologia de Guimaraes et al. (2002), com a equação Área foliar = 0,7458*Largura*Comprimento da folha, expresso em cm². No mesmo estágio foi realizada também a avaliação de altura de plantas e da inserção da espiga em m. A altura de plantas corresponde à medida da distância do colo da planta até a inserção da folha bandeira, e a altura de inserção da espiga corresponde à distância entre o colo da planta e o nó da inserção da espiga. O diâmetro do colmo foi determinado no primeiro entrenó acima do colo da planta, com um paquímetro digital. O comprimento das raízes foi determinado com régua milimetrada (cm planta); além da massa fresca e seca das raízes (g planta) (KAPPES et al., 2010).

O teor de clorofila (estádio VT) foi avaliado na folha bandeira de cada planta, baseada na metodologia de Witham et al. (1971) e Meschede et al. (2011). Para avaliação dos teores de N, P e K, seguiram-se os métodos descritos em Miyazawa (1992), a partir da coleta da folha índice (primeira inferior e oposta à espiga principal) de cada planta.

A coleta das plantas (estádio VT) foi efetuada cortando-se o material rente ao solo, separando folhas de caule, para serem acondicionados em sacos de papel e secos em estufa a 70°C até massa constante para a determinação de massa seca de folhas e de caule (SILVA, 2009).

3.4.5 Ensaio 4: Coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho

Foi utilizada uma amostra de solo da camada 0 - 0,20 m, coletada em Ponta Grossa, Paraná, de um solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico de textura argilosa. Após seca ao ar, destorroada e passada em peneira de malha 4 mm, e acondicionada em vasos plásticos de 8 kg. Suas características físico-químicas eram: pH (CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹) 5,5; 4,84 cmol_c dm⁻³ de H⁺ + Al³⁺; 5,42 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺; 3,29 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺; 0,3 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 14,15 cmol_c dm⁻³ de

CTC; 65,66% de saturação por bases; 5,3 mg dm⁻³ de P (Mehlich-1); 32,24 g dm⁻³ de C; 54,7%, 31,7% e 13,6%, respectivamente, argila, silte e areia.

Testaram-se 10 tratamentos utilizando-se o delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, em arranjo fatorial 2x6, correspondente a dois genótipos de milho, variedade IPR 164 e híbrido DOW 2B587, combinados com quatro inoculantes (10⁸ UFC mL⁻¹ de cada espécie) a partir da inoculação de cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, e *C. brevissima*, coinoculados com *A. brasilense* (Azototal®), mais um tratamento controle sem inoculação e outro apenas com *A. brasilense*.

As sementes foram inoculadas momentos antes da semeadura com os inoculantes (5 mL de inoculante para 1 kg de semente). A inoculação consistia em se colocar as sementes e o produto em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante sobre as mesmas.

Foram semeadas manualmente cinco sementes por vaso a 2 cm, deixando uma só planta aos 10 dias da emergência.

A adubação nitrogenada (ureia 46%) na semeadura foi equivalente a 20 kg de N ha⁻¹ para todos os tratamentos e de cobertura, realizada aos 35 dias após a emergência das plântulas (estádio V6), com aplicação de 160 kg de N ha⁻¹ em todos os tratamentos. A adubação de base foi constituída pela aplicação das fontes superfosfato triplo (120 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e cloreto de potássio (50 kg ha⁻¹ de K₂O).

Aos 63 dias (estádio VT) foram realizadas as seguintes avaliações: altura de plantas e da inserção da espiga, diâmetro do colmo, comprimento das raízes, teor de clorofila, teor foliar de N, P e K, massa das raízes, folhas e de caule, usando as metodologias descritas anteriormente (ensaio 3).

3.4.6 Análises estatísticas

O crescimento das cianobactérias (Ensaio 1) foi avaliado separadamente para cada espécie de cianobactéria, pela análise de regressão usando o software SIGMA PLOT® 12.5, a 5% de probabilidade de erro pelo teste *t*. Os resultados obtidos nos demais ensaios foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e realizada análise de normalidade dos resíduos e homogeneidade entre as variâncias dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e Hartley, respectivamente. Se o teste F foi significativo, as médias (Ensaio 2) foram comparadas pelo teste de

Duncan, a 5% de probabilidade de erro e Tukey a 5% de probabilidade de erro (Ensaio 3 e 4). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Ensaio 1: Crescimento de cianobactérias em meio BG11 modificado

Na figura 3.1 observa-se a biomassa seca (g L^{-1}) das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura. Foram encontrados modelos de regressão polinomial, no meio BG11 sem N e decrescente para BG11 sem N suplementado.

Analisando a cianobactéria *N. muscorum*, são verificadas diferenças nos dias 5, 10 e 30, com maior resposta no meio suplementado. No dia 20 destacou o meio BG11 sem N. Foi encontrada maior biomassa seca no quinto dia, usando o meio suplementado com extrato de levedura (Figura 3.1). Rosales-Loaiza et al. (2016) mencionam que *Nostoc* pode ser cultivada sob deficiência de nitrogênio e *Anabaena* sp. necessita de N para produção de biomassa enriquecida com proteínas e carboidratos.

Para a *Anabaena* sp. foram encontradas diferenças em todas as épocas avaliadas, com maior quantidade de biomassa no meio suplementado, sendo o quinto dia o que obteve melhor resultado (Figura 3.1). Rosales-Loaiza et al. (2016) comparando o crescimento de espécies de cianobactérias em meio suplementado com nitrato de sódio, obtiveram o maior valor de massa seca aos 30 dias de *Anabaena* sp. com $2,49 \text{ g L}^{-1}$ em meio com $8,5 \text{ mM}$ de NaNO_3 . Já na presente pesquisa foram encontrados menores valores, mas em menos tempo (cinco dias). Entretanto, mantendo-se cultivos contínuos é possível obter maior quantidade de biomassa que os autores mencionados.

Estudando a cianobactéria *A. cylindrica* houve diferenças nos dias 5, 10, 15 e 20, destacando-se o meio suplementado. Maior biomassa seca foi obtida no quinto dia, no meio de cultura BG11 suplementado com extrato de levedura (Figura 3.1).

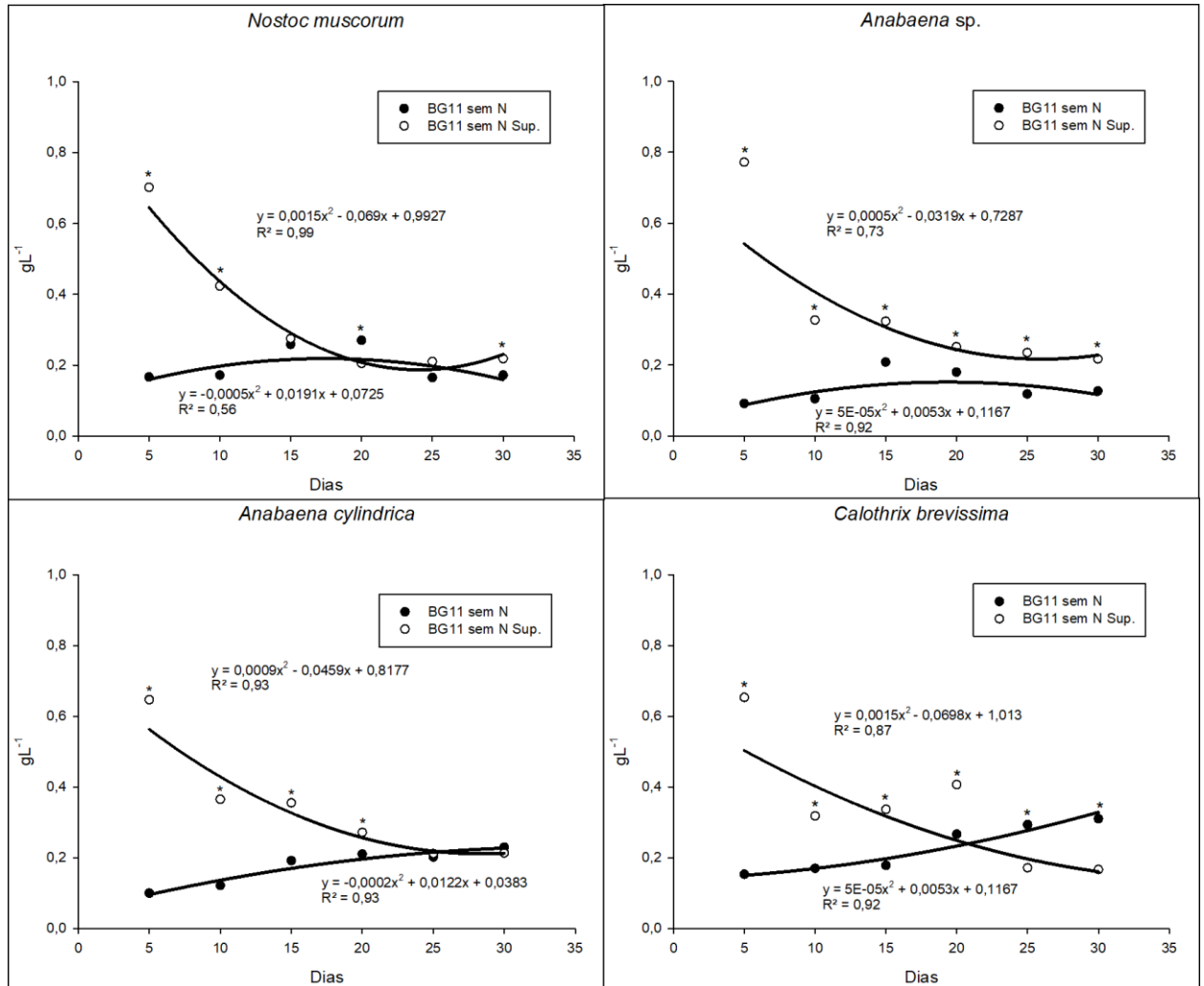
Na cianobactéria *C. brevissima*, nos dias 5, 10, 15 e 20 foram encontrados maiores valores no meio suplementado. Já nos dias 25 e 30 houve efeitos

contrários. Maior biomassa seca é mostrada no quinto dia, no meio de cultura suplementado (Figura 3.1).

Li et al. (2017) estudaram a viabilidade de simbioses entre fototróficas-heterotróficas, testadas por meio do emparelhamento de estirpes de levedura *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotoru laglutinis* e *Saccharomyces cerevisiae* com a cianobactéria *Synechococcus elongatus*. A *S. elongatus* não mostrou crescimento no meio padrão de BG-11 com extrato de levedura, mas cresceu bem em meio BG-11 sem suplemento. O crescimento de uma variedade diversa de cianobactérias é inibido por metabólicos exógenos, como aminoácidos, embora a síntese endógena seja obrigatória.

Aminoácidos como glutamina, lisina, bem como a histidina também inibiram o crescimento da cianobactéria *Synechocystis* sp. (LABARRE et al., 1987). Este fato pode explicar o que aconteceu nesta pesquisa, onde até os cinco primeiros dias, no meio suplementado com extrato de levedura, as cianobactérias aproveitaram alguns compostos do extrato para sua multiplicação, e depois a maior formação de aminoácidos inibiu esse crescimento. Assim também provavelmente o resultante do acúmulo de resíduos de metabolismo que acabou acumulando e inibindo o crescimento após os cinco dias no meio suplementado.

Figura 3.1 - Biomassa seca (g L⁻¹) das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meio BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura. Londrina PR, 2017.



*Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, dentro de cada dia de avaliação.

Fonte: o próprio autor.

Na figura 3.2 são mostrados os teores de Clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio ou suplementado com extrato de levedura e os modelos de regressão polinomial com tendência crescente no meio BG11 sem N e decrescente no meio BG11 sem N suplementado.

Para as cianobactérias *A. cylindrica* e *N. muscorum* foram encontrados maiores teores de clorofila no 5º dia, usando o meio suplementado, com valores de $4,75 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,67 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 3.2).

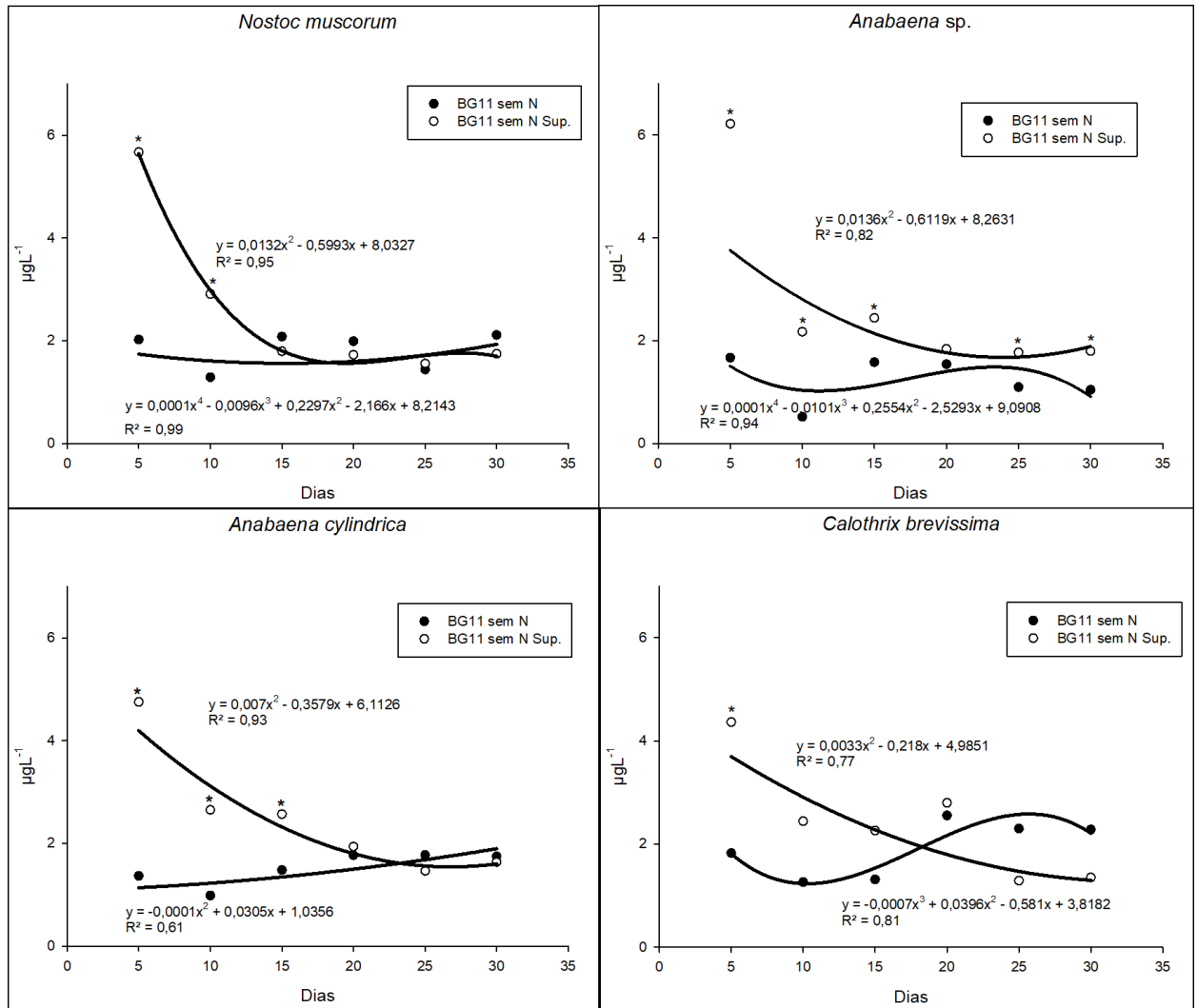
Para *Anabaena* sp., não foi observada diferenças significativas no 20º dia nas outras épocas foram encontradas respostas nos teores de clorofila, com destaque para o meio de cultura suplementado, sendo o maior teor de clorofila no 5º dia, com $6,21 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.2).

Na cianobactéria *C. brevissima*, somente foram encontradas diferenças no quinto dia, com maior teor de clorofila no meio suplementado, com $4,37 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.2).

A medida da clorofila *a* é uma ferramenta importante que ajuda a quantificar o crescimento de um organismo fototrófico, estando positivamente correlacionada com a densidade celular ou a biomassa. Cianobactérias heterocistadas são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, produzir clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas em quantidades significativas. Portanto, as produções desses microrganismos representam uma estratégia metabólica de grande interesse biotecnológico, por ser produzido sob condições diazotróficas (ROSALES-LOAIZA et al., 2016).

Loreto et al. (2003), estudando a produção de pigmentos clorofila *a* e carotenóides da cianobactéria *Anabaena* pcc. 7120 em diferentes concentrações de nitrogênio, não encontraram diferenças entre os tratamentos. O conteúdo de clorofila relatado pelos autores foi de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de carotenóides $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ aos 30 dias.

Figura 3.2 – Teor de clorofila a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) no meio cultivado com as cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura. Londrina PR, 2017.



*Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, dentro de cada dia de avaliação.

Fonte: o próprio autor.

Na figura 3.3, encontram-se os resultados dos carotenóides ($\mu\text{g L}^{-1}$) das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meio BG11 sem nitrogênio ou suplementado com extrato de levedura, apresentando modelos de regressão polinomial, com diferentes comportamentos.

Observa-se que em *N. muscorum*, não foram encontradas diferenças significativas entre os meios de cultura, mesmo assim, um maior valor de carotenóides foi observado no 5º dia em meio suplementado, com $2,73 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.3).

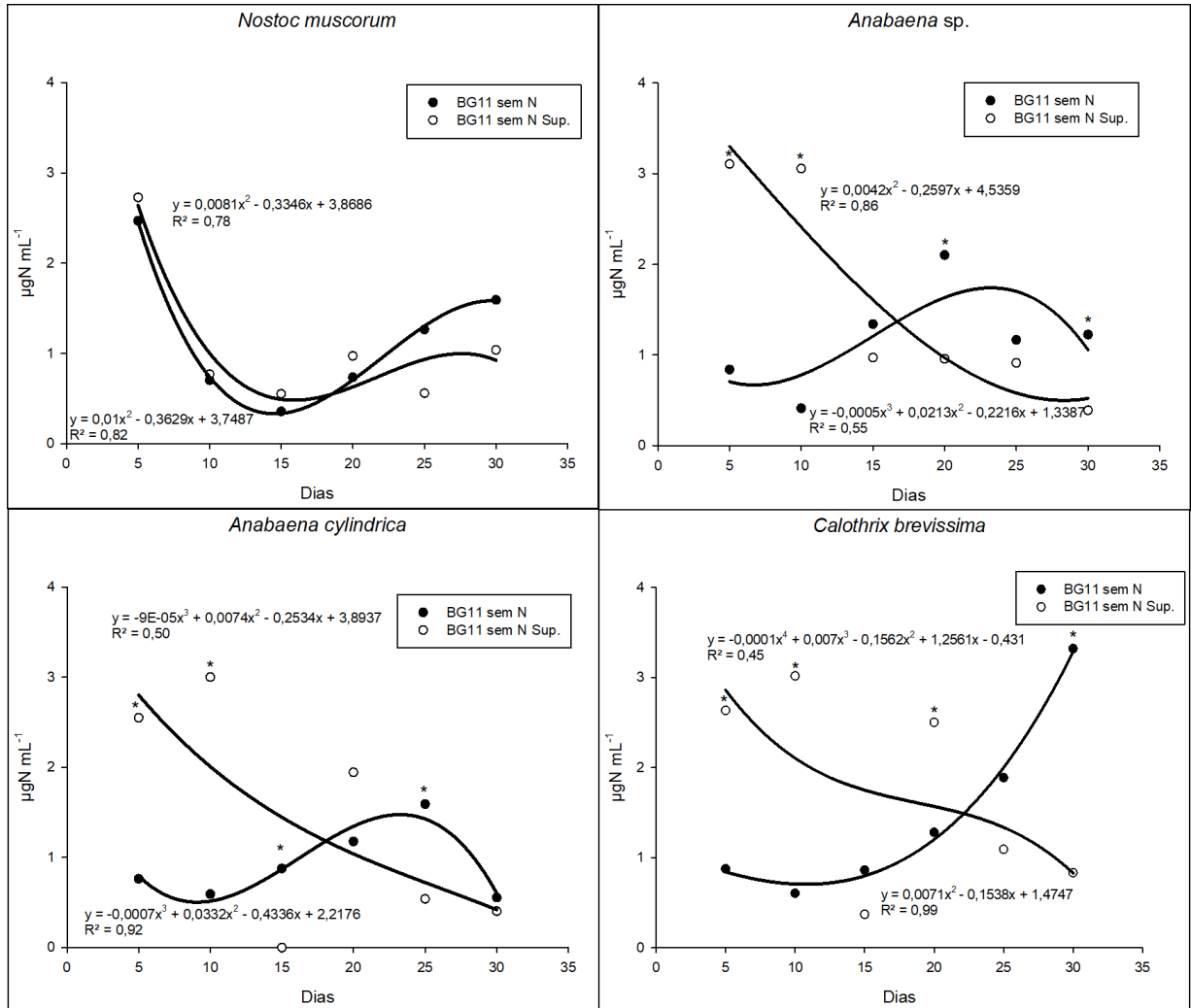
Para a cianobactéria *Anabaena* sp. foram encontrados maiores valores no quinto e décimo dia em meio suplementado, sobretudo no 5º dia ($3,15 \mu\text{g L}^{-1}$). Para o meio sem suplementação aos 20 e 30 dias os valores de carotenóides foram superiores (Figura 3.3).

Analisando a cianobactéria *A. cylindrica*, observam-se melhores resultados no quinto e décimo dia em meio suplementado, com maior valor no décimo dia ($3,02 \mu\text{g L}^{-1}$). Em meio sem suplemento, encontraram-se maiores valores nas avaliações aos 15 e 25 dias (Figura 3.3).

Em *C. brevissima* o meio suplementado mostrou maiores valores no quinto, décimo e vigésimo dia de avaliação. Na avaliação aos 30 dias encontrou-se maiores valores no meio sem N ($3,32 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 3.3).

Os carotenóides em cianobactérias têm duas funções principais, servem como pigmentos de coleta de luz para fotossíntese e protegem contra danos fotoxidativos. São geralmente compostos isoprenóides hidrofóbicos que são sintetizados em membranas. Eles se acumulam principalmente em complexos de proteínas na membrana fotossintética, na membrana celular e na parede celular (HIRSCHBERG;CHAMOVITZ, 1994).

Figura 3.3 – Teor de carotenóides ($\mu\text{g L}^{-1}$) no meio cultivado com as cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e suplementado com extrato de levedura. Londrina PR, 2017.



*Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, dentro de cada dia de avaliação.

Fonte: o próprio autor.

Na figura 3.4 são apresentados os teores de nitrogênio ($\mu\text{g L}^{-1}$) das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem N e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, apresentando modelos de regressão polinomial em função do tempo das avaliações.

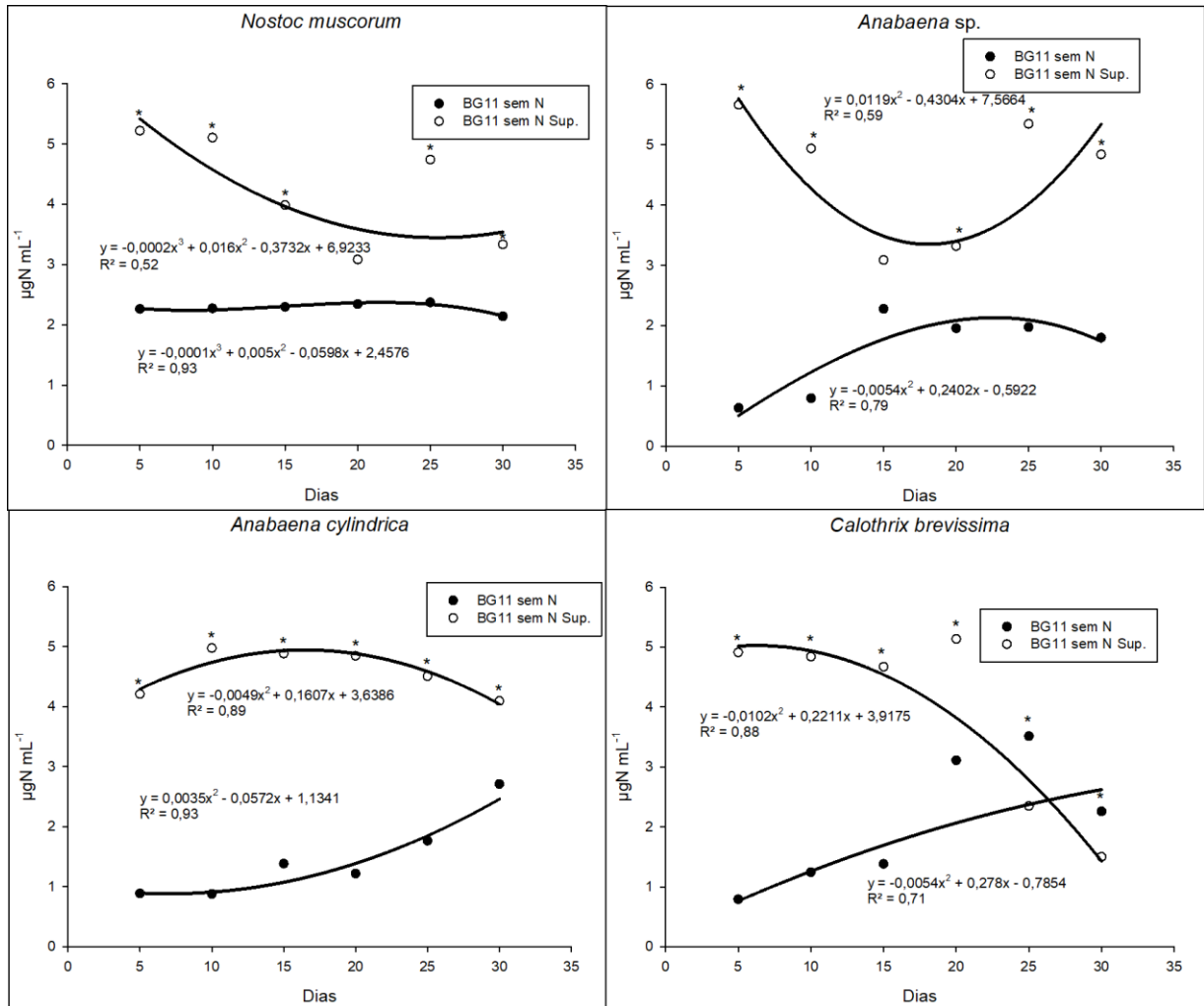
Para *N. muscorum* a diferença entre os meios não foi significativa somente no 20º dia, com maiores teores de nitrogênio no meio suplementado e, maior valor no 5º dia ($5,22 \mu\text{g L}^{-1}$). Para *Anabaena* sp., não houve diferenças entre os meios de cultura somente no 15º dia (3º coleta). O maior teor de nitrogênio fixado aconteceu no 5º dia, em meio suplementado, com $5,66 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.4).

Em *A. cylindrica* nas seis coletas o meio suplementado destacou-se com maior teor de nitrogênio, com maior valor no 10º dia ($4,97 \mu\text{g L}^{-1}$). Para *C. brevissima* foram obtidos maiores valores do 5º ao 20º dia em meio suplementado, com maior teor de N no 20º ($5,13 \mu\text{g L}^{-1}$). Em meio não suplementado melhores respostas ocorreram no 25º e 30º dia (Figura 3.4).

As cianobactérias dos gêneros *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, entre outras, produzem nitrogênio biologicamente disponível, tanto em vida livre como em simbiose, por possuir células diferenciadas chamadas de heterocistos, especializadas na fixação do nitrogênio atmosférico (ALLISON et al., 1937; RAI et al., 1978; BERGMAN et al., 2007; MURO-PASTOR et al., 2017).

Em estudo efetuado por Andrade;Colozzi Filho (2014), foi observada a FBN por estirpes de cianobactérias *in vitro* em meio BG11 sem N. Após o cultivo de cianobactérias, o N existente foi quantificado,mostrando que, as estirpes testadas foram capazes de fixar N *in vitro*, com valores entre 1,08 para a estirpe IPR7029 e $3,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a IPR7061, valores similares aos encontrados no presente estudo, em meio BG11 sem N. Já no meio suplementado foram encontrados maiores teores, possivelmente pela influência do extrato de levedura usado.

Figura 3.4 – Teor de Nitrogênio ($\mu\text{g L}^{-1}$) em meio cultivado com as cianobactérias *N. muscorum*, *A. cylindrica*, *Anabaena* sp. e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura. Londrina PR, 2017.



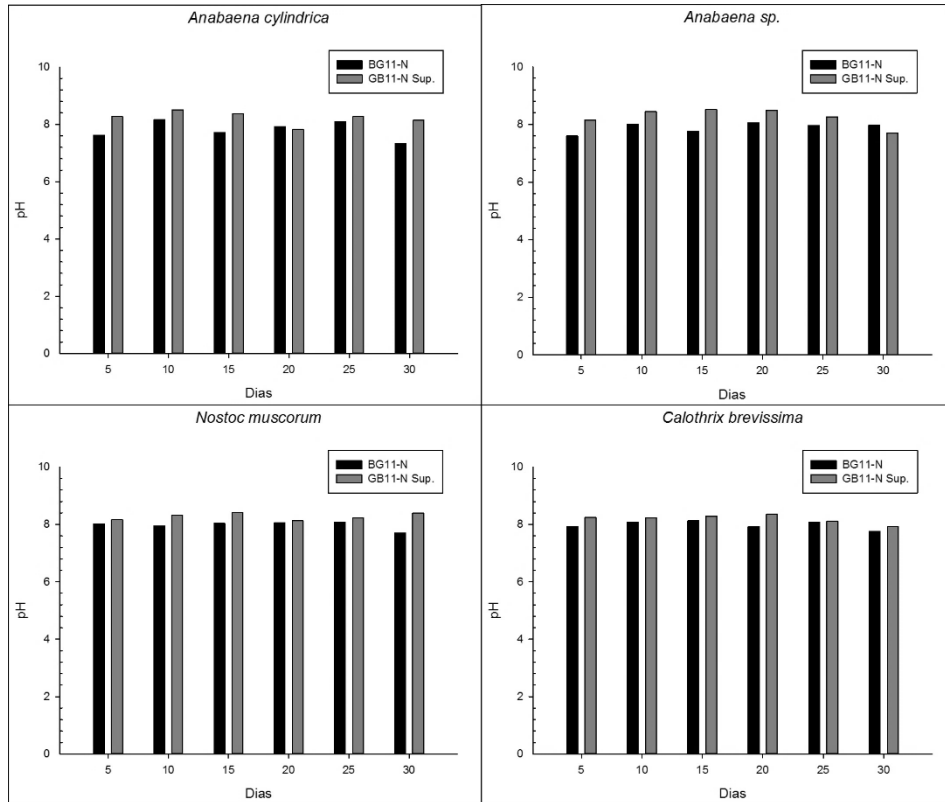
*Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, dentro de cada dia de avaliação.

Fonte: o próprio autor.

Na figura 3.5 são mostradas as os valores de pH no meio de cultura cultivado com as cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, em meios BG11 sem nitrogênio ou BG11 sem N suplementado com extrato de levedura.

Não foram encontradas diferenças significativas, com valores variando de 7,61 a 8,16 para o meio BG11 sem N e de 7,69 a 8,52 para o meio BG11 sem N suplementado (Figura 3.5).

Figura 3.5 - pH do meio de cultura cultivado com as cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* e *C. brevissima*, crescidas em meios BG11 sem nitrogênio e BG11 sem N suplementado com extrato de levedura. Londrina PR, 2017.



Fonte: o próprio autor.

Todas as cianobactérias crescidas em meio BG11 modificado apresentaram comportamentos distintos quanto aos seus atributos biomassa seca, teor de clorofila, teor de carotenóides e teor de N. A *Anabaena* sp. em meio de cultura BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, obteve os melhores resultados para os parâmetros da curva de crescimento, no quinto dia.

3.5.2 Ensaio 2: Cianobactérias na germinação e desenvolvimento inicial do milho

Na tabela 3.2 são mostrados os valores de germinação de sementes de milho inoculadas com cianobactérias e as características de crescimento e desenvolvimento inicial de plântulas.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos quanto a germinação, o que é vantajoso, pois algumas espécies de cianobactérias possuem ficotoxinas (JAKUBOWSKA;SZELAĞ-WASIELEWSKA, 2015) que podem provocar a morte do embrião das sementes.

As cianobactérias *A. cylindrica* (28,00 cm), *C. brevissima* (29,25 cm) e *N. muscorum* (28,75 cm) crescidas em meio BG11 sem N e a cianobactéria *A. cylindrica* crescida em meio suplementado favoreceram a altura de em relação ao controle (21,50 cm).

Foi encontrado maior diâmetro do pseudocaule das plântulas do milho no tratamento com *A. cylindrica* em meio suplementado (2,89 cm), diferindo do tratamento com *Anabaena* sp. em meio suplementado e do controle (Tabela 3.2).

Para a massa fresca da raiz, verificou-se maior valor para *N. muscorum* em meio BG11 sem N (1,89 g), em relação ao controle (0,95 g). Já na massa seca de raiz a maior resposta foi para *A. cylindrica* em meio BG11 sem N (0,16 g), diferindo do controle (0,09 g).

Analisando o volume da raiz foram encontrados efeitos positivos para *A. cylindrica*, e *N. muscorum* em meio BG11 sem N e *A. cylindrica* em meio suplementado diferindo do controle (Tabela 3.2). Para clorofila total destacou-se *A. cylindrica* em meio BG11 sem N suplementado, diferindo-se do controle. Para carotenóides não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

Mohan et al. (2015) estudando o efeito de 15 cianobactérias na cultura do milho, determinaram que a combinação de todos esses isolados proporciona aumento significativo na germinação, no comprimento foliar e de raízes e no teor de clorofila a (Chl-a). Após três dias, a germinação foi de 55 a 90% quando utilizadas as cianobactérias isoladamente, e quando aplicadas conjuntamente promoveram 100% de germinação. As plântulas que cresceram em consórcio dos 15 isolados com cianobactérias mostraram os maiores valores para comprimento de folha e de raízes aos 10 dias. O teor máximo de Chl-a ($2.56 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi observado quando as raízes

foram inoculadas com os quinze isolados de cianobactérias, revelando que as cianobactérias podem trazer benefícios positivos na cultura de milho.

Os resultados obtidos por Grzesik;Romanowska-Duda (2014) mostram que *Microcystisa eruginosa* MKR 0105, *Anabaena* sp. PCC 7120 (Cianobactéria) e *Chlorella* sp. (microalga) aumentam significativamente a germinação e o crescimento de plântulas de milho e também intensificam alguns processos metabólicos. As culturas de cianobactérias e microalgas podem ser usadas para o cultivo de milho em sistemas agroecológicos e integrado, promovendo proteção ambiental, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos.

Tabela 3.2 Germinação de sementes de milho inoculadas com cianobactérias e avaliação de plântulas em câmara de crescimento. G: Germinação, AP: Altura da plântula, DP: Diâmetro do pseudocaule, MFR: Massa fresca da raiz, MSR: Massa seca da raiz, VR: Volume da raiz, CHL: Clorofila total, CAR: Carotenóides. Londrina PR, 2017.

Microorganismo + meio	G	AP	DP	MFR	MSR	VR	CHL	CAR
	(%)	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(cm ³)	(mg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)
<i>N. muscorum</i> + BG11-N	88,50 a	28,75 a	2,56 ab	1,89 a	0,15 ab	2,08 a	29,23 ab	11,22 a
<i>Anabaena</i> sp. + BG11-N	89,75 a	23,00 ab	2,49 ab	1,22 abc	0,13 abc	1,75 ab	28,59 b	11,11 a
<i>A. cylindrica</i> + BG11-N	87,50 a	28,00 a	2,65 ab	1,66 ab	0,16 a	2,10 a	29,39 ab	12,14 a
<i>C. brevissima</i> + BG11-N	90,25 a	29,25 a	2,58 ab	1,49 abc	0,11 bc	2,03 ab	29,07 ab	11,97 a
<i>N. muscorum</i> + BG11-N sup.	89,25 a	25,88 ab	2,69 ab	1,48 abc	0,14 abc	1,98 ab	32,47 ab	11,99 a
<i>Anabaena</i> sp. + BG11-N sup.	88,00 a	21,38 b	2,18 b	1,07 bc	0,12 abc	1,70 ab	32,36 ab	11,72 a
<i>A. cylindrica</i> + BG11-N sup.	87,75 a	29,13 a	2,89 a	1,68 ab	0,14 abc	2,08 a	33,94 a	11,26 a
<i>C. brevissima</i> + BG11-N sup.	88,00 a	26,75 ab	2,55 ab	1,22 abc	0,13 abc	1,70 ab	32,11 ab	11,94 a
<i>A. brasilense</i>	88,00 a	26,00 ab	2,46 ab	1,35 abc	0,12 abc	1,48 ab	31,71 ab	11,62 a
Controle	85,75 a	21,50 b	2,09 b	0,95 c	0,09 c	1,38 b	28,17 b	10,63 a
CV (%)	3,13	15,12	15,32	29,17	21,50	21,74	9,61	10,18
Média	88,28	25,96	2,51	1,40	0,13	1,83	30,71	11,56

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada variável não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Duncan. * (p) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

I: Inoculantes, MC: Meio de cultura

Fonte: o próprio autor.

Para o teste de germinação de sementes de milho inoculadas com cianobactérias não houve diferenças entre as cianobactérias, indicando que estas não inibem o crescimento das plântulas de milho. A avaliação de plântulas indicou efeitos positivos para *Nostoc muscorum* e *Anabaena cylindrica*, independente dos

meios de cultura em que foram multiplicadas, com bom desenvolvimento inicial de plântulas na maioria das variáveis avaliadas.

3.5.3 Ensaio 3: Características fitométricas do milho com e sem adubação nitrogenada e inoculado com cianobactérias

Foram observados efeitos significativos isolados para inoculantes (I) e adubação (A), nas diferentes variáveis avaliadas em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação (Tabela 3.3). Interação significativa entre inoculantes e adubação (I+A) foi constatada apenas para a variável área foliar (AF).

Tabela 3.3 Resumo da análise de variância (*p*). Características fitométricas de plantas de milho cujas sementes foram inoculadas com cianobactérias, com e sem adição de N mineral. Londrina PR, 2017.

Var.	Ensaio 3				
	Inoculantes	Adubação	I x A	Erro	CV (%)
AP	0,27	0,09	0,99	0,03	8,75
AIE	0,16	0,09	0,88	0,010	8,83
DC	0,04	0,00	0,99	4,01	12,43
AF	0,00	0,00	0,01	186083,83	8,97
MR	0,00	0,00	0,85	8,72	16,76
VR	0,02	0,00	0,91	67,66	19,15
MF	0,01	0,00	0,85	7,53	12,6
MC	0,06	0,87	0,42	251,18	18,22
CHL <i>a</i>	0,52	0,00	0,96	18,76	16,55
CHL <i>b</i>	0,00	0,00	0,26	5,64	25,36
N	0,43	0,00	0,91	5,71	16,11
P	0,09	0,00	0,23	0,15	19,94
K	0,99	0,00	0,38	13,27	17,28

Altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), área foliar (AF), massa da raiz (MR), volume da raiz (VR), massa foliar (MF), massa do caule (MC), Clorofila *a* (Chl *a*), Clorofila *b* (Chl *b*), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Inoculantes (I), Adubação (A), coeficiente de variação (CV).

Fonte: o próprio autor.

Para diâmetro do colmo (DC) houve efeitos positivos das cianobactérias *N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, e *C. brevissima*, diferindo-se do tratamento com *A. brasilense* e do controle (Tabela 3.4).

Para a massa da raiz (MR) a inoculação de *A. cylindrica* resultou em maiores valores, diferindo da inoculação com *N. muscorum*, *A. brasilense* e do controle. Para o volume da raiz, não houve diferenças entre os inoculantes estudados, com menores valores apenas para o tratamento controle (Tabela 3.4).

Para a variável massa foliar (MF), o melhor resultado foi obtido usando a cianobactéria *N. muscorum*, diferindo do controle, sendo diretamente relacionado com a sua produção. Já para o teor de clorofila *b* (CHL *b*), destacou-se *A. cylindrica* sendo estatisticamente superior ao controle (Tabela 3.4).

Mohan et al. (2015), em estudos de 15 cianobactérias isoladas aplicadas como inoculante em milho mostraram aumento significativo no comprimento da raiz, nitrogênio total e atividade da Chl-*a*, revelando que esses isolados de cianobactérias podem trazer resultados positivos para a cultura de milho e podem revelar-se como biofertilizantes efetivos.

O uso de cianobactérias aumenta a atividade biológica na rizosfera das plantas de milho em termos de bactéria totais, atividade biológica, atividade da desidrogenase e da nitrogenase (GHAZAL et al., 2013), além de algumas espécies ter atividade aumentada da citocinina e auxina (STIRK et al., 2002), o que pode resultar na redução do uso de fertilizantes químicos.

Tabela 3.4 Características fitométricas de plantas de milho em resposta à inoculação com cianobactérias, na média de dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura. Londrina PR, 2017.

INO	DC	MR	VR	MF	CHL <i>b</i>
	mm	g	cm ³	g	mg g ⁻¹
<i>N. muscorum</i>	17,83 a	16,65 bc	41,88 a	23,97 a	10,65 ab
<i>Anabaena sp.</i>	17,19 a	19,31 ab	45,75 a	22,51 ab	10,51 ab
<i>A. cylindrica</i>	15,76 a	22,13 a	51,88 a	23,37 ab	11,23 a
<i>C. brevissima</i>	15,57 a	19,81 ab	47,00 a	21,11 ab	8,67 ab
<i>A. brasilense</i>	15,36 b	16,48 b	41,88 a	20,49 ab	7,68 ab
Controle	14,91 b	11,88 c	29,38 b	19,27 b	7,48 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Diâmetro do colmo (DC), massa da raiz (MR), volume da raiz (VR), massa foliar (MF), Clorofila *b* (Chl*b*).

Fonte: o próprio autor.

Na tabela 3.5 são mostradas as características fitométricas de plantas de milho em resposta a dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura. A ausência de nitrogênio em cobertura resultou em maior massa da raiz (MR) e volume de raiz (VR).

Para as variáveis diâmetro do colmo (DC), massa foliar (MF), Clorofila *a* (Chla), Clorofila *b* (Chlb), Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K), os maiores valores foram observados na dose de 60 kg N ha⁻¹.

Tabela 3.5 Características fitométricas de plantas de milho em resposta a dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura, na média de seis níveis de inoculação. Londrina PR, 2017.

DOSES	DC	MR	VR	MF	CHL <i>a</i>	CHL <i>b</i>	N	P	K
	mm	cm ³	cm ³	g	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹
0 kgN ⁻¹	15,22B	20,31A	48,71A	20,20B	22,20B	6,01B	10,64B	1,65B	19,38B
60 kgN ⁻¹	16,98A	15,11B	37,21B	23,37A	30,13A	12,73A	19,023A	2,28A	22,79A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Diâmetro do colmo (DC), massa da raiz (MR), volume da raiz (VR), massa foliar (MF), Clorofila *a* (Chla), Clorofila *b* (Chlb), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K).

Fonte: o próprio autor.

Somente para a variável área foliar foi observada interação entre inoculantes e adubação. Na ausência de adubação nitrogenada de cobertura, as melhores respostas de área foliar foram obtidas com uso da cianobactéria *N. muscorum* (5.771,37 cm²) sendo diferente da *A. cylindrica*, *C. brevissima*, *A. brasilense* e o Controle. Na dose de 60 kg N ha⁻¹, destacou-se a *A. cylindrica* (6.228,06 cm²), da *C. brevissima*, *A. brasilense* e do Controle (Tabela 3.6).

Para as cianobactérias *N. muscorum* e *Anabaena* sp. não foram encontradas diferenças entre as doses de N em cobertura. Já nos tratamentos com *A. cylindrica*, *C. brevissima*, *A. brasilense* e o controle obteve-se diferenças, com maior área foliar na dose de 60 kg ha⁻¹ de N.

Em trabalho realizado por Sholkamy et al. (2012) em casa de vegetação, a biofertilização por *N. muscorum* ou *N. rivulare* aumentou significativamente o comprimento das raízes e a área foliar do milho isoladamente ou em combinação com fertilizante 50 e 100 kg ha⁻¹ de N. A combinação de biofertilização e fertilização nitrogenada, especialmente em 100 kg ha⁻¹ de N, teve mais efeito sobre o crescimento do milho em comparação com a biofertilização isolada, além do

aumento da atividade nitrogenase, efeito acontecido na presente pesquisa com a maior dose de N (60 kg ha⁻¹).

Tabela 3.6 Desdobramento da interação para área foliar, em resposta à inoculação com cianobactérias em dois níveis de adubação (com e sem) nitrogenada aplicada em cobertura. Londrina PR, 2017.

Inoc/N	<i>N. muscorum</i>	<i>Anabaenasp.</i>	<i>A. cylindrica</i>	<i>C. brevissima</i>	<i>A. brasilense</i>	Controle
	Área foliar (cm ²)					
0 kgN ⁻¹	5771,37aA	4887,60abA	4733,03bcB	3931,29 cdB	3804,69dB	3557,47dB
60 kgN ⁻¹	5557,55abA	5462,79abA	6228,06a A	4995,18bcA	4526,07cA	4251,62cA

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: o próprio autor.

O diâmetro do colmo resultou com maior medida com as quatro cianobactérias melhor que *A. brasilense* e o controle, sendo positivo para as plantas pois está diretamente relacionado com a tolerância ao acamamento e o aumento da produção. Para a massa foliar a *Nostoc muscorum*, resultou em maior massa que os outros inoculantes usados, sendo diretamente relacionado com a produção.

3.5.4 Ensaio 4: Coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho

Foram encontrados efeitos isolados significativos para inoculação (I) e genótipos (G) para características avaliadas em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação (Tabela 3.7). Interação significativa entre inoculação e genótipos (I+G), foi observada apenas para a variável teor de K foliar (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Resumo da análise de variância (p). Coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho. Londrina PR, 2017.

Ensaio 4					
	Inoculantes	Genótipo	I x G	Erro	CV (%)
AP	0,12	0,21	0,65	0,03	8,83
AIE	0,01	0,92	0,51	0,01	7,23
DC	0,09	0,12	0,41	6,46	13,50
AF	0,03	0,00	0,54	530935,63	14,21
MR	0,00	0,87	0,94	14,72	18,27
VR	0,00	0,89	0,80	84,47	17,05
MF	0,00	0,18	0,15	18,97	16,24
MC	0,00	0,00	0,27	106,56	16,53
CHL a	0,69	0,91	0,84	9,06	9,56
CHL b	0,00	0,75	0,47	43,25	37,46
N	0,37	0,86	0,97	8,76	13,98
P	0,31	0,20	0,85	0,15	20,17
K	0,23	0,03	0,03	4,60	8,78

Altura de planta (AP), altura da inserção da espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), área foliar (AF), massa da raiz (MR), volume da raiz (VR), massa foliar (MF), massa do caule (MC), Clorofila *a* (Chl*a*), Clorofila *b* (Chl*b*), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K). Inoculantes (I), Adubação (A), Genótipo (G), coeficiente de variação (CV).

Fonte: o próprio autor.

A altura de inserção de espiga foi superior na coinoculação *A. cylindrica*+*A. brasilense*, diferindo do controle (Tabela 3.8). Este resultado difere do obtido por Libório (2016) que não encontrou diferenças usando *A. brasilense*, possivelmente o efeito sinérgico da cianobactéria com *A. brasilense* pode ter incrementado a altura de inserção de espiga.

Para a área foliar, a coinoculação entre *A. cylindrica*+*A. brasilense* destacou-se positivamente, diferindo do controle (Tabela 3.8). Pandolfo et al. (2015) estudando área foliar, não encontraram diferenças com a inoculação de *A. brasilense*, já nesta pesquisa a coinoculação com *A. cylindrica*, resultou em diferenças positivas.

A coinoculação entre *A. cylindrica*+*A. brasilense* propiciou aumento da massa da raiz e do volume da raiz, em relação com *A. brasilense* e o controle (Tabela 3.8).

Foi estabelecida uma pesquisa em casa de vegetação usando cianobactérias *N. muscorum* e *N. rivulare*, inoculada em sementes de milho. Os autores determinaram que a atividade de *Nostoc* foi significativamente aumentada em comparação com o sistema radicular do milho não tratado (SHOLKAMY, 2012).

Foram constatados efeitos positivos da coinoculação *A. cylindrica*+*A. brasilense* na variável massa foliar, diferindo da *N. muscorum*+*A. brasilense* e do controle (Tabela 3.8). Para a variável massa do caule, a mesma coinoculação resultou em maior valor, apresentando diferenças em relação as coinoculações *N. muscorum*+*A. brasilense*, *Anabaena* sp.+*A. brasilense* e do controle. Em trabalho efetuado com plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* spp. foram observados incrementos na massa seca, devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias (REIS JUNIOR et al. 2008).

O efeito dos inoculantes aumentou o teor de clorofila *b*, com destaque na coinoculação da *A. cylindrica*+*A. brasilense*, diferindo-se da *N. muscorum*+*A. brasilense*, *Anabaena* sp.+*A. brasilense*, *A. brasilense* e o Controle (Tabela 3.8). A inoculação apenas com *Azospirillum* sp. não alterou o conteúdo de clorofila das plantas de milho, corroborando os resultados de Bashan et al. (2014). O aumento da clorofila *b*, foi influenciado pela cianobactéria *A. cylindrica* ou *C. brevissima*.

Tabela 3.8 Características fitométricas de plantas de milho em resposta a coinoculação com cianobactérias e *A. brasilense*, média de dois genótipos de milho. Londrina PR, 2017.

INOCULANTES	AIE	AF	MR	VR	MF	MC	CHL <i>b</i>
	m	cm ²	g	cm ³	g	g	mg g ⁻¹
<i>N. muscorum</i> + <i>A. brasilense</i>	1,02 ab	4775,60 ab	20,00 bc	52,50 abc	24,55 b	57,57 b	14,98 b
<i>Anabaena sp.</i> + <i>A. brasilense</i>	1,04 ab	5136,14 ab	22,04 abc	55,38 abc	26,71 ab	60,14 b	15,84 b
<i>A. cylindrica</i> + <i>A. brasilense</i>	1,12 a	5840,45 a	25,91 a	65,00 a	31,69 a	77,59 a	27,16 a
<i>C. brevissima</i> + <i>A. brasilense</i>	1,05 ab	5412,50 ab	22,76 ab	57,50 ab	28,50 ab	62,71 ab	17,68 ab
<i>A. brasilense</i>	1,04 ab	4940,27 ab	18,84 bc	50,38 bc	27,36 ab	64,04 ab	15,75 b
Controle	0,97 b	4664,79 b	16,48 c	42,63 c	22,14 b	52,74 b	13,92 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Altura da espiga (AE), área foliar (AF), massa da raiz (MR), volume da raiz (VR), massa foliar (MF), massa do caule (MC), Clorofila *b* (Chl*b*).

Fonte: o próprio autor.

Houve diferenças entre os genótipos estudados destacando-se o híbrido em relação à área foliar e para a variável massa de caule (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 Características fitométricas de plantas de milho em resposta a dois genótipos, média de seis níveis de inoculação. Londrina PR, 2017.

	AF	MC
	cm ²	g
Var.	4720,45 B	56,76 B
Híb.	5536,15 A	68,17 A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Área foliar (AF), massa do caule (MC).

Fonte: o próprio autor.

Nas coinoculações entre *N. muscorum*+*A. brasilense* e *Anabaena sp.*+*A. brasilense* maiores teores de K foram obtidos com uso da variedade. Nesse caso as coinoculações com *Anabaena sp.*+*A. brasilense* e *C. brevissima*+*A. brasilense* resultaram em maiores teores de K. Já no híbrido, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

A inoculação com *A. brasilense* em milho não promoveu efeitos significativos nos teores de macronutrientes e na produtividade, com exceção dos teores foliares de cálcio e potássio (VASCONSELOS, 2016).

Tabela 3.10 Desdobramento da interação para K foliar, em resposta a coinoculação com cianobactérias e *A. brasilense* e genótipos de milho. Londrina PR, 2017.

Coinoc/Gen.	<i>N. muscorum</i>	<i>Anabaena sp.</i> +	<i>A. cylindrica</i> +	<i>C. brevissima</i> +	<i>A. brasilense</i>	Controle
	+ <i>A. brasilense</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. brasilense</i>		
Potássio foliar (g kg ⁻¹)						
Var.	25,25 ab A	26,75 a A	26,00 ab A	26,50 a A	24,50 ab A	21,75 b A
Híb.	22,00 a B	22,50 a B	24,00 a A	24,25 a A	25,25 a A	24,25 a A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: o próprio autor.

No ensaio da coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* em genótipos de milho, foram encontrados diferentes efeitos das características fitométricas, independente dos genótipos estudados. Na maioria das variáveis obteve maiores respostas no tratamento de coinoculação entre *A. cylindrica*+*A. brasilense*, evidenciando o potencial desses microrganismos para maior desenvolvimento da cultura de milho em casa de vegetação. Entretanto é necessário testar-se em campo para corroborar os seus benefícios em termos de produtividade de grãos.

3.6 CONCLUSÕES

Todas as cianobactérias tiveram comportamentos diferentes, quanto ao crescimento destacando-se a *Anabaena sp.* em meio de cultura BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, para os parâmetros curva de crescimento, biomassa seca, teor de clorofila, teor de carotenóides e teor de nitrogênio, no quinto dia.

Nostoc muscorum e *Anabaena cylindrica*, independente dos meios de cultura em que foram crescidas, tiveram efeitos no desenvolvimento inicial de plântulas de milho, para a maioria das variáveis.

Estudando as características fitométricas da inoculação de sementes de milho usando cianobactérias com e sem nitrogênio em cobertura, foram encontrados efeitos significativos isoladamente para inoculantes em diferentes variáveis avaliadas em casa de vegetação. Para a variável diâmetro do colmo, as quatro cianobactérias isoladamente responderam melhor que *A. brasilense* e o controle. Já para a massa foliar, destacou-se a *Nostoc muscorum*.

As cianobactérias associadas ao *Azospirillum brasilense* têm alto potencial para favorecer a cultura do milho, pelo aumento da massa e volume radicular, assim como o incremento da massa e área foliar.

Houve diferenças entre os comportamentos das características fitométricas, independente dos genótipos estudados, apontando na maioria das variáveis estudadas que a coinoculação entre *Anabaena cylindrica* e *Azospirillum brasilense*, com grande potencial de uso na cultura de milho.

4 ARTIGO B

CIANOBACTÉRIAS NO DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO PRODUTIVO DO MILHO CULTIVADO SOB DOSES DE NITROGÊNIO

4.1 RESUMO

O uso de inoculantes à base de microrganismos diazotróficos é uma alternativa para a diminuição do uso e aumento da eficiência de fertilizantes nitrogenados, principalmente em cereais que são culturas exigentes e responsivas ao nutriente. As cianobactérias, microrganismos procarióticos fotossintetizantes, têm a capacidade de fixar o N_2 atmosférico pelo processo da fixação biológica, entretanto, são pouco estudadas como inoculante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho cultivado em diferentes doses de nitrogênio de cobertura em resposta a inoculação com cianobactérias (*Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*) em duas safras de cultivo. A cultivar de milho utilizada foi a variedade IPR164. Foram testados 16 tratamentos, utilizando-se o delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, em arranjo fatorial 4x4, correspondente a quatro níveis de adubação em cobertura (0, 30, 80 e 130 kg ha⁻¹) com 20 kg ha⁻¹ N na base, totalizando 20, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹ N e quatro níveis de inoculação (sem inoculação, *Anabaena cylindrica*, *Nostoc muscorum*, e inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense*). Foram avaliadas: altura de planta, altura de inserção da espiga, diâmetro do colmo, índice de área foliar, clorofila foliar, teor foliar de N, P e K, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, número de grãos por espiga, número de espigas por plantas, teor de N nos grãos, massa de 1000 grãos e produtividade de grãos. As características fitométricas e desempenho produtivo do milho não foram alteradas pela interação entre doses de N e inoculantes, demonstrando que as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias. A inoculação com *Anabaena cylindrica* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo do milho e resultou em incremento na produtividade de grãos em 912,00 kg ha⁻¹ (20,46%) na safra 1 e de 1020,00 kg ha⁻¹ (21,11%) na safra 2, em relação ao controle.

Palavras chave: *Anabaena cylindrica*, *Nostoc muscorum*, características fitométricas, componentes de produção, bactérias promotoras de crescimento de plantas, *Zea mays*.

CYANOBACTERIA IN THE DEVELOPMENT AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF MAIZE CULTIVATED UNDER NITROGEN DOSES

4.2 ABSTRACT

The use of inoculants based on diazotrophic microorganisms is an alternative to decrease the use and increase the efficiency of nitrogen fertilizers, especially in grains that are demanding and nutrient responsive crops. The cyanobacteria, photosynthetic prokaryotic microorganisms, have the capacity to fix the atmospheric N_2 by the process of biological fixation, however, have been little studied as inoculant. The objective of this work was to evaluate the development and productive performance of maize grown at different rates of nitrogen in topdress in response to inoculation with cyanobacteria (*Anabaena cylindrica* and *Nostoc muscorum*) in two crop seasons. The maize cultivar was IPR164 variety. Sixteen treatments were tested using a randomized complete block design with four replications, in a 4x4 factorial arrangement, corresponding to four levels of topdress N fertilization (0, 30, 80 and 130 kg ha⁻¹) with 20 kg ha⁻¹ N at sowing, totaling 20, 50, 100 and 150 kg ha⁻¹ N and four levels of inoculation (without inoculation, *Anabaena cylindrica*, *Nostoc muscorum*, and commercial inoculant based on *Azospirillum brasilense*). Plant height, stem insertion height, stem diameter, leaf area index, leaf chlorophyll, leaf content of N, P and K, number of rows per ear, number of grains per row, number of grains per ear, number of ear per plant, N content in the grain, mass of 1000 grains and grain yield were assessed. The phytometric characteristics and yield of maize were not altered by the interaction between N doses and inoculants, demonstrating that N doses do not interfere with cyanobacteria performance. The inoculation with *Anabaena cylindrica* favored the development and yield performance of maize and resulted in an increase in grain yield of 912 kg ha⁻¹ (20.46%) in the season 1 and 1020 kg ha⁻¹ (21.11 %) in season 2, in relation to the control.

Keywords: *Anabaena cylindrica*, *Nostoc muscorum*, phytometric characteristics, yield components, plant growth-promoting bacteria, *Zea mays*.

4.3 INTRODUÇÃO

O milho é cultivado amplamente em todas as zonas agro-ecológicas das regiões áridas, semi-áridas, temperadas e tropicais do mundo. É um dos cereais mais importantes mundialmente para a segurança alimentar e é particularmente importante nas dietas dos países menos favorecidos da África e da América Latina. É usado diretamente para consumo humano, ração animal, forragens, produção de óleo, processamento industrial de alimentos, farmacêutico e biocombustíveis (NEENAN et al., 1973; DOWSELL et al., 1996; SHIFERAW et al., 2011; ADIAHA et al., 2016; SHARMA;MEHTA, 2016).

Entre os genótipos modernos de milho, estão os híbridos e variedades de polinização abertas melhoradas, caso em que são desenvolvidos fenótipos relativamente uniformes, mas sem homogeneidade genética dos híbridos (IVERSEN et al., 2014). Embora as variedades geralmente produzam menos que os híbridos modernos, são mais adequadas para sistemas agrícolas que utilizam menor aporte de insumos. A maior variabilidade genética dessas variedades traz mais adaptabilidade e rusticidade, além do fato de que o agricultor pode produzir suas próprias sementes para a próxima safra, reduzindo significativamente os custos de produção (LANA et al., 2017).

Após o carbono, o nitrogênio (N) é o elemento necessário em maiores quantidades pelas plantas: cerca de 1-5% da matéria seca total da planta é constituída por N, que é um componente de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitormônios e metabólitos secundários. Embora a adubação nitrogenada proporcione aumento do rendimento de grãos, esta técnica por ter elevado custo para os agricultores (JAMA et al., 2017), sendo necessária a diminuição da quantidade das doses de N para tornar o cultivo mais econômico. Por sua vez, a baixa eficiência de uso de nitrogênio e os impactos ambientais adversos causados pela fertilização nitrogenada ameaçam cada vez mais a sustentabilidade da agricultura (DUAN et al., 2014).

O N₂ só pode ser usado como fonte de N pelas plantas que são capazes de formar simbiose ou associação com bactérias que fixam N₂ (HAWKESFORD et al., 2012), capazes de reduzir o N₂ atmosférico, tornando-o prontamente disponível às plantas. Dentre esses microrganismos o gênero *Azospirillum* tem sido o mais estudado na última década (RADWAN et al., 2004). Estirpes de *Azospirillum*

brasilense (Ab-V5 e Ab-V6) têm sido amplamente usadas como inoculante comercial no Brasil (FUKAMI et al., 2017), especialmente para as Poaceas como milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010; MARKS et al., 2015; FUKAMI et al., 2016). Existem alguns microrganismos procarióticos fotossintetizantes chamados de cianobactérias que também têm a capacidade de fixar o N_2 atmosférico pelo processo de fixação biológica de Nitrogênio (FBN), podendo ser utilizadas em substituição potencial aos fertilizantes nitrogenados. Entretanto, ainda são pouco explorados como inoculantes para as diferentes culturas.

Cianobactérias tais como *Nostoc*, *Tolypothrix*, *Anabaena* e *Aulosira*, têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e enriquecer a fertilidade do solo (SAHU et al., 2012). Assim, as cianobactérias podem contribuir para o aumento da produtividade das culturas pela disponibilização de nitrogênio.

A inoculação com cianobactérias pode beneficiar a cultura do milho, suprimindo a necessidade de N pela cultura, reduzindo doses do fertilizante nitrogenado, tornando-se o seu estudo de relevância ambiental e econômica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho cultivado sob diferentes doses de nitrogênio de cobertura em resposta à inoculação com cianobactérias (*Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*) em duas safras de cultivo.

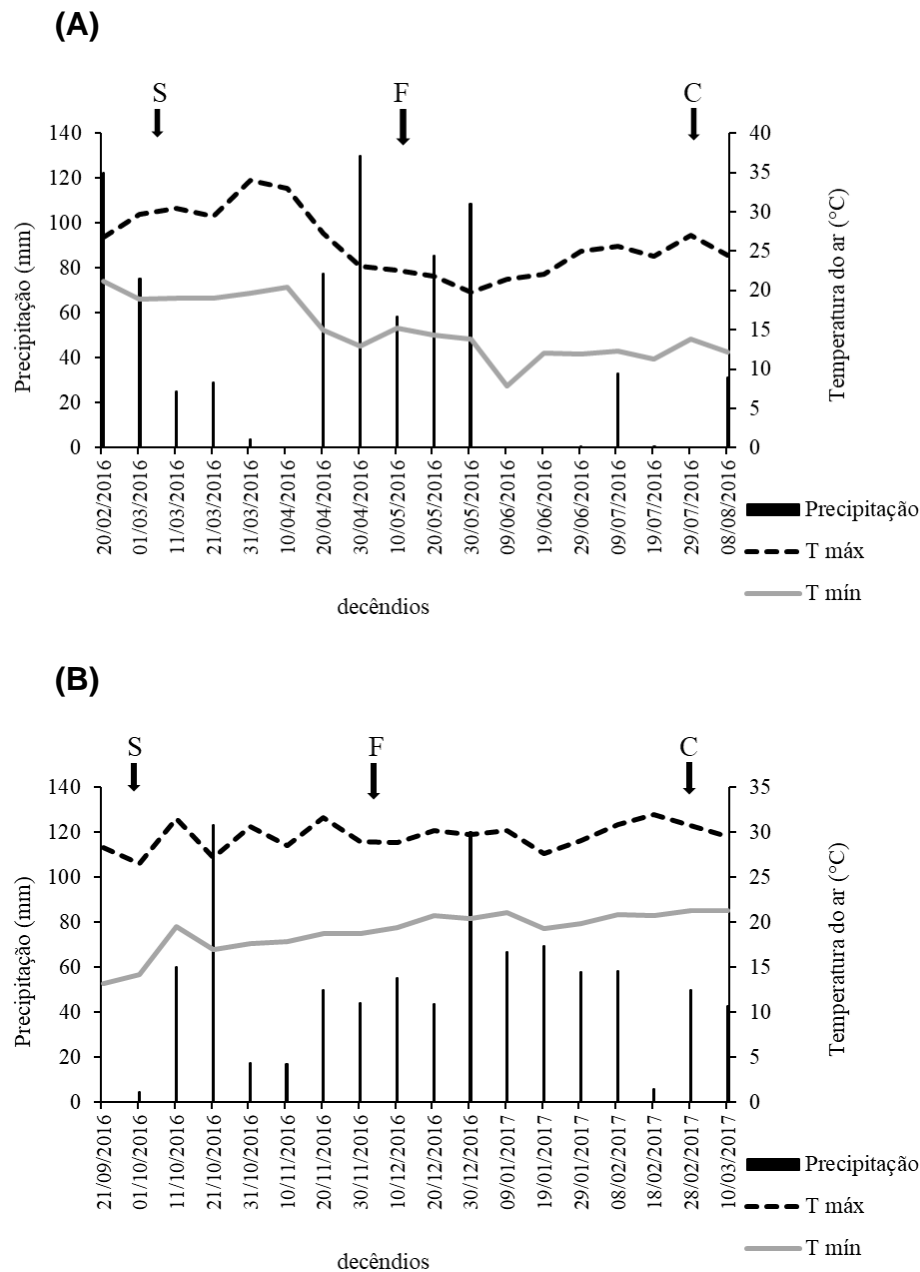
4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em duas safras agrícolas (segunda safra em 2016 e primeira safra em 2016/17), no Instituto Agrônomo do Paraná em um Latossolo Vermelho Distroférico, muito argiloso (810 g kg^{-1} de argila) de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2013), localizado no município de Londrina (PR), coordenadas geográficas $23^{\circ}23' \text{ S}$ e $51^{\circ} 11' \text{ W}$, altitude média 566 m e clima, segundo classificação de Köppen, do tipo Cfa - subtropical úmido.

As características físico-químicas do solo na profundidade de 0-20 cm eram: pH (CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) 4,65; $6,94 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$; $3,14 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Ca^{2+} ; $1,25 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Mg^{2+} ; $0,32 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de K^+ ; $11,65 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de CTC; 40,43% de saturação por bases; $3,99 \text{ mg dm}^{-3}$ de P (Mehlich-1); $17,21 \text{ g dm}^{-3}$ de C; 81%, 13% e 60%, respectivamente, argila, silte e areia. Os dados meteorológicos de precipitação

pluvial e temperaturas durante a condução dos experimentos foram obtidos junto à estação meteorológica do IAPAR (Figura 4.1).

Figura 4.1 Precipitação pluvial e temperaturas do ar, máxima e mínima (T máx e T mín) no município de Londrina Paraná, referente aos períodos experimentais (04/03/2016 a 02/08/2016) Safra 1 **(A)** e (29/09/2016 a 28/02/2017) Safra 2 **(B)**, com indicação da semeadura (S), início do florescimento (F) e colheita (C), Londrina-PR, 2017.



Fonte: o próprio autor.

A cultivar de milho utilizada foi a variedade IPR164, ciclo precoce, porte médio de 2,30 m, indicada para cultivo no verão (primeira safra) e safrinha (segunda safra) no Paraná.

Foram testados 16 tratamentos em delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, em arranjo fatorial 4x4, correspondente a quatro níveis de adubação nitrogenada em cobertura (0, 30, 80 e 130 kg ha⁻¹) com 20 kg de N ha⁻¹ na base, totalizando 20, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹ N, combinando com o controle (sem inoculação) e três inoculantes, sendo duas cianobactérias (*Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*) e um inoculante comercial (*Azospirillum brasilense*).

As cianobactérias foram obtidas do Banco de Cultivos do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, com capacidade de fixar N₂ atmosférico, por produzir altas biomassas em crescimento sem qualquer forma de N combinado na água do meio de cultivo. O *Azospirillum brasilense* usado foi o inoculante comercial Azototal da empresa Total Biotecnologia (estirpes AbV5 e AbV6 com 2,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹).

Para a manutenção e crescimento das cianobactérias foi usado o meio de cultura BG11 (STANIER et al., 1971) sem nitrogênio, em câmara de crescimento durante 30 dias, com fotoperíodo de 12 h e temperatura controlada de 30,0 ± 2,0°C na fase luminosa, e 22,0 ± 2,0°C na fase escura. A densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR - photosynthetically active radiation*) foi de 100 ± 20 μE m⁻² s⁻¹ medidos com porômetro Licor (INC modelo LI-1600), sendo esta fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares, dispostas paralelamente na parte superior dos recipientes para o cultivo das cianobactérias.

As cianobactérias, depois de 30 dias de crescimento, foram concentradas pela centrifugação a 4000 × g (modelo Z383 HERMLE K) durante 10 min a 25,0 °C, e diluídas em meio BG11 sem N até atingir a concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. As sementes foram inoculadas previamente à semeadura. A dose aplicada foi de 5 mL para 1 kg de sementes, com estimativas teóricas de 27.0000 células por semente (HUNGRIA et al., 2010). A inoculação consistiu em se colocar as sementes e o produto em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante.

As parcelas foram constituídas de seis linhas de semeadura com seis metros de comprimento, com espaçamento entre linhas 0,90 m e espaçamento entre plantas de 0,14 m (77.777 plantas por hectare). A área de cada parcela foi de 32,4 m², com área útil delimitada pelas quatro linhas centrais, totalizando 13,5 m².

A semeadura foi realizada manualmente, em sistema de plantio direto. A adubação de base foi constituída pela aplicação das fontes superfosfato triplo (120 kg ha⁻¹ de P₂O₅), cloreto de potássio (50 kg ha⁻¹ de K₂O) e ureia (20 kg ha⁻¹ de N). A adubação de cobertura foi realizada aos 35 dias após a emergência das plântulas (estádio V6) de acordo com as doses pré-estabelecidas nos tratamentos.

Foram realizados os tratos culturais e o manejo de plantas daninhas, pragas e doenças de acordo com as recomendações do Sistema de Produção da Cultura do Milho (EMBRAPA, 2015).

As medidas das características fitométricas foram iniciadas depois de 50% de florescimento das plantas, em que foram tomadas dez plantas ao acaso dentro da área útil. Foram avaliadas a altura de planta (AP) e de inserção de espigas (AIE) em cm, por meio da medida da distância entre a superfície do solo e a base do pendão e da espiga principal, respectivamente. As mesmas plantas foram utilizadas para a avaliação do diâmetro do colmo (DC) em mm, o qual foi medido com ajuda de um paquímetro digital no terço mediano do segundo internódio a partir da base da planta, no sentido do menor diâmetro.

A avaliação do índice de área foliar (IAF), expresso em m² de folha por m² de superfície do solo, foi efetuada no estágio VT, usando um medidor de área foliar laser (CI-203, CID, Bio-Science, USA) com duas leituras por folha, amostrando-se cinco plantas escolhidas aleatoriamente na área útil. Os valores foram calculados conforme a expressão do IAF proposta por Francis et al. (1969). Neste estágio, foram coletadas três folhas índice de cada parcela e secas em estufa com circulação forçada de ar (60±2 °C), por 72h, para serem trituradas para determinação do teor de N, P e K foliar (EMBRAPA, 2009).

Para determinação do conteúdo foliar de clorofila (mg g⁻¹), amostras de 0,2 g de tecido foliar fresco de três plantas foram preparadas e os extratos filtrados, sendo efetuadas leituras em espectrofotômetro (663 e 645 nm para clorofila total) baseado na metodologia de Witham et al. (1971) e Meschede et al. (2011).

Ao final do ciclo da cultura (150 dias), foram colhidas as espigas na área útil das parcelas determinando-se a prolificidade que é o número de espigas por plantas (PROL). Foram separadas aleatoriamente dez espigas de cada parcela, nas quais foram avaliadas por meio da contagem o número de fileiras de grãos por espiga (NFE), o número de grãos por fileira (NGF) e o número de grãos por espiga (NGE).

A massa de 1000 grãos, expressa em gramas, foi determinada após a debulha dos grãos das espigas de cada parcela útil, de acordo com Brasil (2009). A produtividade de grãos foi obtida por meio da pesagem dos grãos colhidos na área útil da parcela experimental, com umidade corrigida para 13% (umidade de armazenamento para grãos de milho) e ajuste dos dados para kg ha^{-1} . O teor de N dos grãos foi determinado segundo Miyazawa (1992).

Foi realizada análise de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e Hartley, respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). As curvas de produtividade de grãos de milho, foram avaliadas pela análise de regressão usando o software SIGMA PLOT® 12.5.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para doses de N em cobertura e inoculação foram observados efeitos significativos em diferentes características avaliadas nas duas safras de cultivo (Tabela 4.1). Não foi constatada interação significativa entre doses de N e Inoculações (D x I) para nenhuma das características avaliadas. Portanto, as características fitométricas e desempenho produtivo do milho não foram alteradas pela interação, demonstrando que as doses de N empregadas em cobertura não interferem na ação dos microrganismos promotores de crescimento avaliados. De maneira similar, no estudo efetuado por Dartora et al. (2013) não houve interação significativa entre a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* com a adubação nitrogenada para as características fitométricas e de produção de milho. Já Galindo et al. (2016) encontraram interação entre doses de N e inoculação, destacando que até 200 kg ha^{-1} N houve maior rendimento de grãos para o milho que foi inoculado com *A. brasilense*.

Tabela 4.1 Resumo da análise de variância (p) das características fitométricas, componentes de produção, e produtividade da cultura do milho inoculado com duas cianobactérias e com *Azospirillum brasilense*, sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura. Londrina PR, 2017.

Var.	Doses N		Inoculantes		D x I		Erro		CV (%)	
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
AP	0,02	0,18	0,00	0,01	0,54	0,86	65,98	0,01	4,55	5,49
AIE	0,47	0,33	0,05	0,01	0,81	0,97	74,84	35,74	10,03	6,75
DC	0,71	0,60	0,04	0,03	0,67	0,95	2,30	2,70	8,17	8,06
IAF	0,49	0,88	0,05	0,02	0,99	0,94	0,16	0,20	8,54	10,79
Chl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,82	11,91	13,96	8,91	9,54
N	0,62	0,45	0,00	0,12	0,77	0,95	3,23	4,49	7,62	9,08
P	0,35	0,09	0,31	0,00	0,90	0,97	0,02	0,04	4,79	7,19
K	0,37	0,95	0,29	0,14	0,83	0,89	4,00	3,84	7,88	8,42
NFE	0,55	0,33	0,01	0,17	0,52	0,49	0,49	0,69	4,92	5,81
NGF	0,30	0,99	0,93	0,07	0,47	0,36	7,56	5,75	8,62	6,45
NGE	0,56	0,20	0,83	0,08	0,64	0,32	4003,43	3792,12	16,96	13,90
PROL	0,49	0,17	0,97	0,89	0,63	0,76	0,00	0,01	3,75	8,18
NG	0,61	0,10	0,05	0,04	0,91	0,96	1,07	1,47	8,43	8,72
MMG	0,59	0,00	0,02	0,08	0,99	0,24	2361,73	2493,55	11,12	12,89
PROD	0,47	0,00	0,00	0,00	0,69	0,85	464928,7	600426,4	14,04	15,67

Altura de planta (AP), altura da inserção de espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), índice de área foliar (IAF), clorofila (Chl), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), número de fileiras de grãos por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF), número de grãos por espiga (NGE), número de espigas por plantas (PROL), teor de Nitrogênio do grão (NG), massa de 1000 grãos (MMG), produtividade (PROD). Doses (D), Inoculantes (I). Coeficiente de variação (CV).

Fonte: o próprio autor.

Na tabela 4.2 são apresentadas características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta à inoculação com cianobactérias e com *Azospirillum brasilense* (*Abr*). Na safra 1 nota-se, para a variável altura de planta (AP), efeitos positivos das cianobactérias *Nostoc muscorum* (*Nmu*) e *Anabaena cylindrica* (*Acy*), em relação ao controle. Observa-se que a inoculação com a cianobactéria *Acy* foi melhor que o controle, com maiores diâmetros do colmo (DC), índice de área foliar (IAF), massa de mil grãos (MMG) e nitrogênio no grão (NG). Para o teor de clorofila foliar (CHL) houve respostas similares quando foram usadas as cianobactérias *Nmu* e *Acy*, sendo superiores do *Abr* e o controle.

Quanto ao teor foliar de N, não houve diferenças entre os inoculantes estudados, que se mostraram superiores ao controle. O inoculante comercial *Abr* foi

superior no número de fileiras por espiga (15) que a inoculação com as cianobactérias estudadas e o controle (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta à inoculação com cianobactérias e *Azospirillum brasilense*, média de quatro doses de nitrogênio. Londrina PR, 2017.

SAFRA 1										
INO	AP	AIE	DC	IAF	CHL	N	P	NFE	MMG	NG
	cm	cm	mm	m ² /m ²	mg g ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	número	g	g kg ⁻¹
<i>Nmu</i>	182,88A	88,81 ^{ns}	18,56AB	4,74AB	41,87A	23,97A	2,68 ^{ns}	13,75B	447,58AB	12,35AB
<i>Acy</i>	180,25A	86,33 ^{ns}	19,19A	4,89A	42,21A	24,50A	2,62 ^{ns}	14,00B	463,79A	12,65A
<i>Abr</i>	178,56AB	87,56 ^{ns}	18,78AB	4,71AB	37,58B	23,84A	2,69 ^{ns}	15,00A	426,09AB	12,53AB
<i>Ctr</i>	172,25B	80,88 ^{ns}	17,65B	4,49B	33,27C	21,94B	2,63 ^{ns}	14,25AB	411,33B	11,67B
SAFRA 2										
<i>Nmu</i>	1,77AB	89,37AB	20,15AB	4,17AB	38,68B	23,12 ^{ns}	2,78B	14,25 ^{ns}	366,18 ^{ns}	13,74AB
<i>Acy</i>	1,85A	92,35A	21,41A	4,46A	45,95A	24,32 ^{ns}	2,99A	14,50 ^{ns}	377,03 ^{ns}	14,61A
<i>Abr</i>	1,77AB	88,00AB	20,33AB	4,02B	39,12B	23,33 ^{ns}	2,81AB	14,75 ^{ns}	396,08 ^{ns}	13,84AB
<i>Ctr</i>	1,72B	84,81B	19,69B	4,03B	32,85C	22,50 ^{ns}	2,70B	14,50 ^{ns}	409,87 ^{ns}	13,34B

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Altura de planta (AP), altura de inserção da espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), índice de área foliar (IAF), clorofila (Chl), Nitrogênio (N), Fósforo (P), número de fileiras de grãos por espiga (NFE), massa de 1000 grãos (MMG), teor de Nitrogênio dos grãos (NG). *Nostoc muscorum* (*Nmu*), *Anabaena cylindrica* (*Acy*), *Azospirillum brasilense* (*Abr*), Tratamento controle (*Ctr*). **Fonte:** o próprio autor.

Na Safra 2 (Tabela 4.2), verificam-se efeitos positivos para as variáveis AP, AIE, DC, e NG com a cianobactéria *Acy*, diferindo-se somente do controle. Para o IAF, nota-se melhor efeito usando a cianobactéria *Acy*, diferindo dos tratamentos *Abr* e controle. Analisando a CHL são mostrados efeitos positivos somente para a inoculação com *Acy*. Para o teor foliar de P, maior valor foi observado com a inoculação da *Acy*, em relação a *Nmu* e controle (Tabela 4.2).

Alguns trabalhos relatam os efeitos da inoculação em medidas fitométricas do milho. Silva Libório (2016) e Pandolfo et al. (2015) mencionam que a inoculação de *A. brasilense* no milho não altera a altura de plantas e altura de inserção da espiga, como observado neste estudo com aplicação de *Abr*. Maqubela et al. (2009) e Prasanna et al. (2016), usando cianobactérias dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*, encontraram respostas para o crescimento de plantas de milho, corroborando no

presente estudo com a aplicação da *Acy* e *Nmu*, diferindo do controle. Pandolfo et al. (2015), estudando o efeito da inoculação das sementes de milho com a bactéria *A. brasilense*, não obtiveram respostas significativas para o diâmetro de colmo e índice de área foliar, em comparação aos obtidos pela cianobactéria *Acy*.

Os teores de clorofila e nutrientes são parâmetros importantes para prever a produção do milho e, a inoculação com microrganismos podem influenciá-los. A inoculação com *Abr* não alterou o conteúdo de clorofila das plantas do milho, corroborando os resultados relatados por Bashan et al. (2014) e Longhini et al. (2016), diferindo das cianobactérias *Nmu* e *Acy* para a safra 1 e de *Acy* para a safra 2. Sarig et al. (1988), Galindo et al. (2016), Hungria et al. (2010) e Longhini et al. (2016) mostraram que a inoculação com *Azospirillum* aumentou os teores de N, P e K no milho. Similarmente, a aplicação de cianobactérias como inoculante ajuda na absorção de macro e micronutrientes, favorecendo as comunidades microbianas na rizosfera de híbridos de milho, com economia em fertilizantes químicos (GHAZAL et al., 2013; PRASANNA et al., 2015; PRASANNA et al., 2016).

Hungria et al. (2010), em ensaios com inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*, não observaram aumentos do conteúdo de N nos grãos de milho, corroborando os dados obtidos nesta pesquisa para o tratamento com *A. brasilense*. Entretanto, a inoculação com *Acy* resultou em maior teor de N nos grãos, nas duas safras, evidenciando assim maior eficiência de aproveitamento do N aplicado, por efeito da cianobactéria. Cavallet et al. (2000), estudando a inoculação à base de *Azospirillum* spp. e diferentes doses de nitrogênio na cultura do milho, mencionam que não houve efeitos sobre o número de fileiras de grãos por espiga, diferindo da presente pesquisa em que foram encontrados efeitos na safra 1.

As médias das características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta às quatro doses de N em cobertura são apresentadas na tabela 4.3. Na safra 1, a variável AP, apresentou maior valor na dose de 130 kg ha⁻¹ N. As doses de 30 e 80 kg ha⁻¹ N, mostraram comportamento semelhante, para a CHL. Na safra 2, são mostrados efeitos nas doses 80 e 130 kg ha⁻¹ N, para teor de CHL de igual maneira, nas mesmas doses foram encontradas respostas para MMG, valores superiores aos encontrados na dose 0 kg ha⁻¹ N.

Tabela 4.3 Características fitométricas e componentes de produção na cultura do milho em resposta à quatro doses de nitrogênio, na média de inoculação com cianobactérias e *Azospirillum brasilense*. Londrina PR, 2017.

SAFRA 1			
Dose N kg ha ⁻¹	AP	CHL	MMG
	cm	mg g ⁻¹	g
0	175,94ab	35,94b	428,90 ^{ns}
30	180,63ab	39,53a	434,57 ^{ns}
80	174,63b	41,29a	434,14 ^{ns}
130	182,75 a	38,19ab	451,19 ^{ns}
SAFRA 2			
0	1,75 ^{ns}	35,25b	359,24b
30	1,79 ^{ns}	38,55ab	370,65ab
80	1,76 ^{ns}	41,23a	412,47a
130	1,82 ^{ns}	41,56a	406,79a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Altura de planta (AP), Clorofila (Chl), Massa de 1000 grãos (MMG).

Fonte: o próprio autor.

Ferreira Gomes et al. (2007) não verificaram efeito sobre a massa de mil grãos com o aumento da dose de N aplicada à cultura do milho. Os mesmos autores mencionam que a dose de 150 kg ha⁻¹ N proporcionou maiores valores de rendimento de grãos, teor de N nas folhas, peso de grãos por espiga e altura de plantas.

Torres et al. (2015) mencionam que a adição de N promove ainda mais o desenvolvimento de plantas de milho, aumenta os níveis de clorofila e nutrientes, massa de 1000 grãos e produtividade, com grande efeito na presença de *A. brasilense*. Já na presente pesquisa, não foram obtidos efeitos do N na produtividade do milho.

Observa-se que a inoculação com *Acy*, promoveu as maiores médias de produção, tanto para a safra 1 quanto para a safra 2, em relação ao controle (Tabela 4.4). Comparando-se as doses de N, houve diferenças positivas na safra 2, destacando-se a dose de 130 kg ha⁻¹ N com 5.645 kg ha⁻¹ de grãos, diferindo das doses de 0 e 30 kg ha⁻¹ N.

A inoculação com a cianobactéria *Anabaena cylindrica* resultou em incremento em relação ao tratamento controle de 912 kg ha⁻¹(20%) de grãos de

milho na safra 1 e de 1.019 kg ha⁻¹(21%) na safra 2 (Tabela 4.4), demonstrando ser superior à inoculação com *Azospirillum brasilense* nas duas safras avaliadas.

Tabela 4.4 Produtividade (kg ha⁻¹) e incremento de grãos de milho inoculado com cianobactérias e *Azospirillum brasilense* sob quatro doses de nitrogênio em cobertura. Londrina PR, 2017.

Inoc/ Dose	SAFRA 1					SAFRA 2				
	Dose N (kg N ha ⁻¹)				Média	Dose N (kg N ha ⁻¹)				Média
	0	30	80	130		0	30	80	130	
Produtividade	kg ha⁻¹					kg N ha⁻¹				
<i>Nmu</i>	4918	4997	4877	4791	4896AB	4494	4437	5406	5526	4966AB
<i>Acy</i>	4986	5357	6108	4996	5362A	4741	5320	5729	6100	5473A
<i>Abr</i>	4719	4518	4717	4933	4722AB	3699	4580	5629	5660	4892AB
<i>Ctr</i>	4196	4392	4615	4595	4449B	3563	4436	4516	5296	4453B
Média	4705	4816	5079	4829		4124c	4693bc	5320ab	5645a	
Incremento	kg ha⁻¹ (%)					kg ha⁻¹ (%)				
<i>Nmu</i>	721(17)	604(14)	262(6)	196(4)	446(10)	930(23)	0,84(0)	890(17)	229(4)	513(11)
<i>Acy</i>	789(19)	965(22)	1493(32)	401(9)	912(20)	1177(29)	884(19)	1213(23)	804(14)	1019(21)
<i>Abr</i>	523(12)	125(3)	102(2)	337(7)	272(6)	136(3)	144(3)	1113(21)	364(6)	439(8)

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. *Nostoc muscorum*(*Nmu*), *Anabaena cylindrica* (*Acy*), *Azospirillum brasilense* (*Abr*), Tratamento controle (*Ctr*).

Fonte: o próprio autor.

Repke et al. (2013) mencionam que a inoculação da bactéria diazotrófica *A. brasilense* via inoculação líquida nas sementes, acompanhada ou não de doses de fertilizante nitrogenado, não interfere no desenvolvimento de plantas e na produtividade da cultura do milho transgênico, divergindo dos resultados observados neste estudo com uma variedade.

Hungria et al. (2010) estudaram nove estirpes de *Azospirillum* na inoculação com milho, obtendo incrementos na produtividade de 24 a 30%, correspondendo a 662 a 823 kg ha⁻¹, mencionando que quando comparada a fertilização nitrogenada ao uso da inoculação com *A. brasilense*, a fertilização não reduz o potencial do inoculante. Cavallet et al. (2000) também obtiveram resultados positivos, constatando aumento de 17% na produtividade de grãos de milho, de 5211 para 6067 kg ha⁻¹ com o uso do inoculante. Esses valores mencionados nas duas pesquisas relatadas anteriormente diferem dos resultados obtidos no presente estudo com *A. brasilense*.

Campos et al. (2000) com a utilização do inoculante, contendo bactérias do gênero *Azospirillum* (Graminante®), não obtiveram resposta para rendimento de grãos. Isso pode ser atribuído ao efeito da resteva da leguminosa, que provavelmente minimizou os efeitos do nitrogênio entre os tratamentos, fornecendo esse nutriente através da decomposição de seus resíduos, com baixa relação carbono/nitrogênio. Já Dobbelaere et al. (2003) obtiveram respostas positivas com a inoculação com *A. brasilense*, inclusive em altos níveis de nitrogênio, indicando que as respostas do milho não ocorrem apenas em razão do N₂ fixado, mas, também, da produção de outras substâncias promotoras de crescimento.

Díaz-Zorita et al. (2015) demonstraram, em diversos estudos de campo, principalmente na América Latina e na Ásia, o aumento na produtividade de grãos de culturas inoculadas com *Azospirillum* sp. principalmente em cereais. Observaram que a maioria dos estudos foi realizada com culturas de cereais (86,7%), principalmente milho irrigado. Entre todas as culturas relatadas, a resposta média à inoculação com *Azospirillum* sp. foi de 10,0% de aumento na produção de grãos, com maiores rendimentos para cereais de inverno (14,0%) que cereais de verão (9,5%) ou leguminosas (6,6%). Em relação à inoculação usando *Anabaena cylindrica* da presente pesquisa foram alcançadas maiores porcentagens que os obtidos na literatura para *Azospirillum*.

Prasanna et al. (2016), avaliando o rendimento de grãos de milho, não encontraram efeitos da inoculação com cianobactérias em relação ao controle, já na presente pesquisa foram encontradas melhores respostas com uso da cianobactéria *Acy*.

Os resultados demonstraram benefícios da inoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* na variedade de milho IPR164, destacando-se tanto na Safra 1 como na Safra 2, especialmente em termos do teor de N nos grãos e da produtividade de grãos, sendo que na Safra 2 foi obtida maior produtividade, provavelmente por apresentar melhores condições climáticas (verão) para a cultura. Apesar do *Azospirillum brasilense* ser um inoculante comercial recomendado pelos seus efeitos positivos a cultura do milho, resultou o seu uso em menor produtividade do grão que as cianobactérias usadas. Assim, se faz necessário mais pesquisas aplicando cianobactérias como inoculante nas sementes do milho em diferentes genótipos e ambientes, para validar a resposta da cultura à tecnologia.

4.6 CONCLUSÕES

A inoculação com cianobactérias, favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo do milho IPR164, destacando-se a cianobactéria *Anabaena cylindrica*.

As características fitométricas e desempenho produtivo do milho não foram alteradas pela interação entre doses de N e inoculantes, demonstrando que as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias.

A inoculação com *Anabaena cylindrica* resultou em incremento na produtividade de 912 kg ha⁻¹ (20,46%) na segunda safra (safrinha) e de 1020 kg ha⁻¹ (21,11%) na primeira safra (verão), em relação ao controle.

5 ARTIGO C

COINOCULAÇÃO DE *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* NO DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO PRODUTIVO DE HÍBRIDOS DE MILHO

5.1 RESUMO

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais requeridos para a expressão do potencial produtivo do milho. Algumas espécies de cianobactérias têm a capacidade de fixar N atmosférico, podendo isoladamente ou em associação com outros microrganismos, como o *Azospirillum*, promover o crescimento e o desempenho produtivo da cultura, com respostas variáveis de acordo com o híbrido utilizado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e desempenho produtivo de quatro híbridos de milho. Os experimentos foram conduzidos a campo em dois locais (Londrina-PR e Faxinal-PR) sob o delineamento experimental de blocos casualizados, em arranjo fatorial 4x4, com quatro repetições. Foram avaliados quatro níveis de inoculações (*Anabaena cylindrica*+*Azospirillum brasilense*, *Anabaena cylindrica*, *Azospirillum brasilense* e um controle não inoculado) em quatro híbridos de milho (512 PW, 2A620 PW, 2B810 PW, Status Viptera 3). Foram avaliadas as seguintes características: altura de planta, altura de inserção de espigas, diâmetro do colmo, índice de área foliar, índice de clorofila, teores foliares de nitrogênio, fósforo e potássio, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, número de grãos por espiga, número de espigas por planta, massa de 1000 grãos, teor de nitrogênio nos grãos e produtividade. A coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo dos híbridos de milho com incremento de 967 kg ha⁻¹ (9,37%) em Londrina e 1744 kg ha⁻¹ (23,1%) em Faxinal, em relação ao controle não inoculado. Em relação aos híbridos de milho, estes apresentaram o mesmo comportamento, independentemente da inoculação ou coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Anabaena cylindrica*, sugerindo que a resposta à coinoculação não depende dos genótipos estudados.

Palavras chave: Cianobactéria, bactérias diazotróficas, características fitométricas, componentes de produção, bactérias promotoras de crescimento, *Zea mays*.

5.2 ABSTRACT

COINOCULATION OF *Anabaena cylindrica* WITH *Azospirillum brasilense* IN THE DEVELOPMENT AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF MAIZE HYBRIDS

Nitrogen (N) is one of the most required nutrients for the expression of the productive potential of corn. Some species of cyanobacteria can fix atmospheric N, and can, isolated or associated with other microorganisms, such as *Azospirillum*, promote the growth and productive performance of the crop, showing variable responses according to the hybrid employed. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of inoculation and co-inoculation of the cyanobacteria *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* on the development and yield performance of four corn hybrids. The field experiments were carried out in two locations (Londrina and Faxinal, Paraná State), using a randomized block experimental design, in a 4x4 factorial arrangement, with four replications. Four inoculation levels were evaluated (*Anabaena cylindrica* + *Azospirillum brasilense*, *Anabaena cylindrica*, *Azospirillum brasilense*, and an uninoculated control) in four corn hybrids (512 PW, 2A620 PW, 2B810 PW, Status Viptera 3). The following characteristics were evaluated: plant height, ear insertion height, stem diameter, leaf area index, chlorophyll index, nitrogen, phosphorus and potassium leaf content, number of grain rows per ear, number of grains per row, number of grains per ear, number of ear per plant, mass of 1,000 grains, nitrogen content in the grains and yield. The co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* favored the development and yield performance of corn hybrids, with an increase of 967 kg ha⁻¹ (9.37%) in Londrina and 1,744 kg ha⁻¹ (23.1%) in Faxinal, in comparison with the uninoculated control. The corn hybrids showed the same behavior, regardless of the inoculation or co-inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Anabaena cylindrica*. Suggesting that the response to co-inoculation does not depend on the studied genotypes.

Keywords: *Anabaena cylindrica*, diazotrophic bacteria, phytometric characteristics, production components, growth promoters, *Zea mays*.

5.3 INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas agrícolas do mundo, com ampla utilização na alimentação humana e animal, e também é matéria-prima industrial importante para diversos produtos, sendo estratégico para a segurança alimentar e econômica de vários países (LI;JIANG, 2017). Os avanços nas características agrônômicas dos genótipos e nas práticas de manejo são fundamentais para o aumento da produtividade e rentabilidade da cultura (MARINI et al., 2015).

Independente do genótipo, o nitrogênio é o elemento mais requerido e o que mais frequentemente limita a produtividade da cultura do milho (DETONI et al., 2017), sendo comum o seu fornecimento via fertilizantes químicos, o que além de aumentar os custos de produção, pode trazer inúmeros problemas ambientais. O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), capazes de fixar N, é uma opção para reduzir a quantidade aplicada e diminuir os custos de produção (PEREIRA-DEFILIPPI et al., 2017).

O genótipo de milho é um fator chave para beneficiar a interação planta-bactéria, sobre a sobrevivência e atividade das bactérias promotoras de crescimento no ambiente rizosférico (MARINI et al., 2015). A identificação e seleção de genótipos mais responsivos à prática da inoculação é essencial para garantir a repetibilidade e o aumento do rendimento (SALOMONE;DÖBEREINER, 1996; MARTINS et al., 2012).

Durante a última década, várias bactérias capazes de fixar N₂ foram descritas, sendo o gênero *Azospirillum* o mais estudado (RADWAN et al., 2004). O *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) tem sido usado amplamente como inoculante comercial no Brasil (FUKAMI et al., 2017), com efeitos positivos na produção de matéria seca de grãos e acúmulo de nitrogênio nas plantas, especialmente em gramíneas como milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010; MARKS et al., 2015; FUKAMI et al., 2016) e em forrageiras como a *Urochloa* sp. (syn. *Brachiaria*) (HUNGRIA et al., 2016).

Além do *A. brasilense* existem outros microrganismos com funções similares como as cianobactérias, especialmente as filamentosas que contêm células diferenciadas chamadas de heterocistos, especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico (MURO-PASTOR et al., 2017). Em adição à FBN, as cianobactérias melhoram a resistência às condições climáticas severas, pela alta viscosidade do gel

protoplasmático e presença do revestimento que contém heteropolissacarídeos de alto peso molecular e uma pequena proporção de proteínas (ZULPA et al., 2008).

Em cultivo de milho em casa de vegetação, a inoculação no solo com *Anabaena* sp. melhorou a proporção de agregados devido ao aumento de carbono e, possivelmente devido à presença de heteropolissacarídeos. Ainda, devido à habilidade de fixar o N atmosférico, essa cianobactéria também incrementou em até 40% o N do solo, bem como aumentou a produção de massa seca das plantas (MAQUBELA et al., 2009).

A coinoculação de bactérias associativas, que possuem alta atividade de fixação de nitrogênio, aumenta a tolerância às condições ambientais adversas, aumentando a capacidade de competir com a comunidade microbiana nativa, e tem sido utilizada com sucesso para melhorar o crescimento de plantas em relação à inoculação individual (KRUASUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; YEGORENKOVA et al., 2016). Existem vários exemplos da coinoculação com *Azospirillum brasilense*, em diversas culturas, como com *Bradyrhizobium* em soja (HUNGRIA et al., 2013; CHIBEBA et al., 2015; HUNGRIA et al., 2015), com *Glomus intraradices* em tomate (LIRA-SALDIVAR et al., 2014), *Bradyrhizobium* em amendoim (VICARIO et al., 2016), *Rhizobium tropici* em feijão (HUNGRIA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016), e *Paenibacillus polymyxa* em trigo (YEGORENKOVA et al., 2016), entre outras.

Anabaena cylindrica é uma cianobactéria que contribui na FBN por apresentar heterocistos além de ter atividade na solubilidade do ferro pela produção de sideróforos (ITOU et al., 2001). Assim, a cianobactéria *Anabaena cylindrica*, isolada ou em associação com *Azospirillum brasilense*, tem alto potencial para favorecer o desenvolvimento da cultura de milho, pela disponibilização de nutrientes como o nitrogênio e efeitos na promoção de crescimento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e desempenho produtivo de quatro híbridos de milho, em duas condições edafoclimáticas no estado do Paraná.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição das áreas experimentais

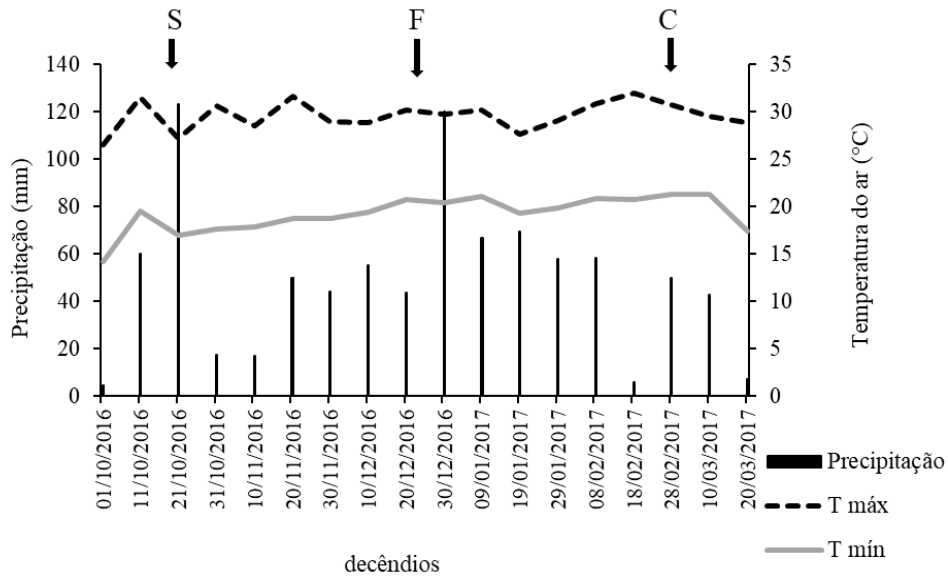
Os ensaios foram realizados na safra 2016/2017 em dois locais com características edafoclimáticas contrastantes. O primeiro foi realizado em área experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em um Latossolo Vermelho distroférico muito argiloso (810 g kg⁻¹ de argila), (SANTOS et al., 2013), localizado no município de Londrina (PR), coordenadas geográficas 23°23' S e 51° 11' W, altitude média 566 m. O segundo ensaio foi realizado no município de Faxinal (PR), em um Nitossolo Vermelho eutroférico, areno-argiloso (350 g kg⁻¹ de argila) (SANTOS et al., 2013), com coordenadas geográficas 24°07'0,6" de latitude S e 51° 20'35,0" de longitude W, altitude média 480 m.

As características físico-químicas do solo na profundidade de 0-20 cm eram: em Londrina pH (CaCl₂ 0,01mol L⁻¹) 4,55; 6,94 cmol_c dm⁻³ de H⁺ + Al³⁺; 2,91 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺; 1,27 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺; 0,32 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 11,44 cmol_c dm⁻³ de CTC; 39,33% de saturação por bases; 3,39 mg dm⁻³ de P (Mehlich-1); 17,78 g.dm⁻³ de C. Em Faxinal, pH (CaCl₂ 0,01mol L⁻¹) 5,7; 1,29 cmol_c dm⁻³ de H⁺ + Al³⁺; 1,56 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺; 2,04 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺; 0,12 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 5,01 cmol_c dm⁻³ de CTC; 74,25% de saturação por bases; 2,19 mg dm⁻³ de P (Mehlich-1); 9,80 g.dm⁻³ de C.

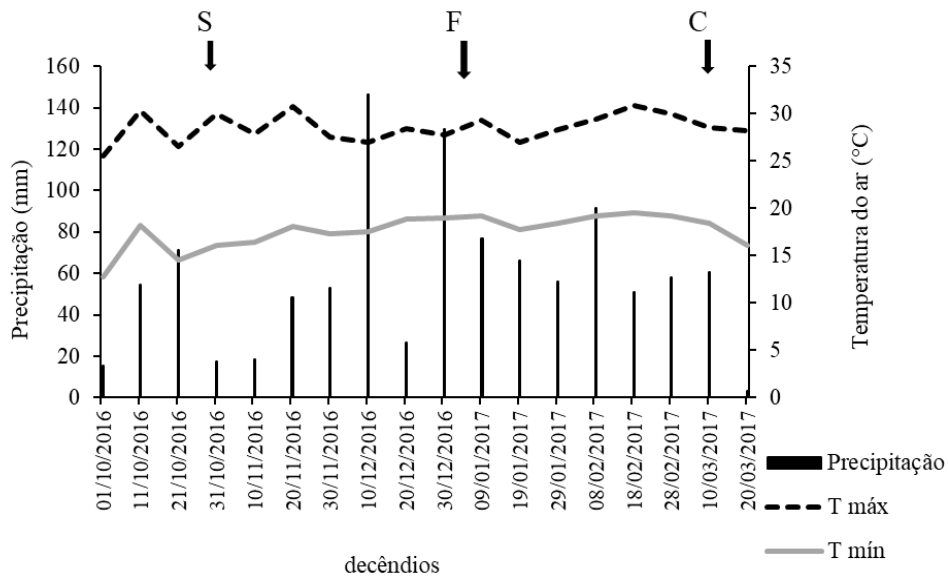
Ambos locais apresentam clima, segundo classificação de Köppen, do tipo Cfa - subtropical úmido. Na figura 5.1 são apresentadas a precipitação pluvial e as temperaturas do ar, máxima e mínima (T máx e T mín), de Londrina e Faxinal durante o período da pesquisa.

Figura 5.1 Precipitação pluvial e temperaturas do ar, máxima e mínima (T máx e T mín) do município de Londrina **(A)** e Faxinal **(B)** Paraná, referente ao período experimental (18/10/2016 a 27/02/2017) com indicação da semeadura (S), início do florescimento (F) e colheita (C).

(A)



(B)



Fonte: o próprio autor.

Tratamentos, delineamento experimental e preparo dos inóculos

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4x4, totalizando 16 tratamentos com quatro repetições. Foram avaliados quatro níveis de inoculação (*Anabaena cylindrica* + *Azospirillum brasilense*, *Anabaena cylindrica*, *Azospirillum brasilense* e um tratamento controle com água) e quatro híbridos de milho (512 PW, 2A620 PW, 2B810 PW, Status Viptera3) de alto nível tecnológico, cujas características agrônômicas são descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 Principais características dos híbridos de milho usados no experimento.

Híbrido	Tipo de Híbrido	Ciclo/dias	Altura de Plantas (cm)	Nível tecnológico
2B512PW	Triplo	Precoce/130	230	Alto
2A620PW	Simples	Precoce/130	220	Alto
2B810PW	Simples	Normal/140	235	Alto
Status Viptera3	Simples	Precoce/130	233	Alto

Fonte: o próprio autor.

A cianobactéria usada foi obtida do Banco de Cultivos do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, com capacidade de fixar N₂ atmosférico, por produzir altas biomassas em crescimento sem qualquer forma de N combinado na água do meio de cultivo.

Para a manutenção e crescimento da cianobactéria foi usado o meio de cultura BG11 (STANIER et al., 1971) sem nitrogênio, em câmara de crescimento, durante 30 dias, com fotoperíodo de 12 h e temperatura controlada de 30,0 ± 2,0°C, na fase luminosa, e 22,0 ± 2,0°C na fase escura. A densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR – photosynthetically active radiation*) foi de 100 ± 20 μE m⁻² s⁻¹ medida com porômetro Licor (INC modelo LI-1600), fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares, dispostas paralelamente na parte superior dos recipientes. A cianobactéria, após 30 dias de crescimento, foi concentrada pela centrifugação a 4000 × g (modelo Z383 HERMLE K) durante 10 min a 25,0 °C, e diluída em meio BG11-N até atingir a concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹.

O *Azospirillum brasilense* usado foi proveniente de inoculante comercial da empresa Total Biotecnologia com marca Azototal® (estirpes AbV5 e AbV6 com 2,0x10⁸ UFC mL⁻¹).

Inoculação e semeadura

As sementes foram inoculadas previamente à semeadura na dose de 100 mL para 20 kg de sementes, com estimativa teórica de 270.000 células por semente (HUNGRIA et al., 2010). A inoculação consistiu de colocar as sementes e o inoculante em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante sobre as mesmas.

A semeadura foi realizada manualmente, no sistema de plantio direto. As parcelas foram constituídas de seis linhas de semeadura com seis metros de comprimento, espaçadas de 0,45 m e espaçamento entre plantas de 0,20 m. A área de cada parcela foi de 13,5 m², com área útil delimitada pelas quatro linhas centrais, desprezando-se 1 m nas extremidades, totalizando 5,4 m².

A adubação de base foi constituída pela aplicação das fontes superfosfato triplo (120 kg ha⁻¹ de P₂O₅), cloreto de potássio (50 kg ha⁻¹ de K₂O) e ureia (20 kg ha⁻¹ de N) e a adubação de cobertura realizada aos 35 dias após a emergência das plântulas (estádio V6), com aplicação de 180 kg ha⁻¹ N para todos os tratamentos.

Avaliações fitométricas e componentes de produção

As características fitométricas foram avaliadas no estágio VT (pendoamento), quando foram tomadas dez plantas ao acaso dentro da área útil, determinando-se a altura de planta (AP) e de inserção de espigas (AIE) em centímetros, por meio da medida da distância entre a superfície do solo e a base do pendão e da espiga principal, respectivamente. O diâmetro do colmo (DC) em milímetros foi medido com ajuda de um paquímetro digital no terço mediano do segundo internódio, a partir da base da planta, no sentido do menor diâmetro.

O índice de área foliar (IAF), expresso em m² de folha por m² de superfície do solo foi estimado com base na aferição do comprimento total (C) e largura do terço médio (L) das folhas fotossinteticamente ativas de dez plantas avaliadas aleatoriamente na área útil de cada parcela. Os valores de comprimento e largura das folhas foram submetidos à expressão do IAF proposta por Francis et al. (1969)

$IAF = \frac{(0,75 * C * L)}{(e1 * e2)}$, em que e1 e e2 referem-se ao espaçamento entre plantas, em metros, na linha de semeadura e entre as linhas, respectivamente.

Por ocasião do florescimento, a folha índice (abaixo e oposta a espiga), de três plantas de cada parcela, foi coletada aleatoriamente preparando-a com corte no terço médio e desprezando a nervura central. Estas foram secadas em estufa com circulação forçada de ar (60 ± 2 °C), por 72 h e trituradas, para determinação do teor de nitrogênio, fósforo e potássio (EMBRAPA, 2009). Para determinação do conteúdo de clorofila (CHL) da parte aérea (mg g^{-1}) foram obtidas no mesmo período, amostras de 0,2 g de tecido fresco da folha bandeira de 3 plantas, que foram maceradas e os extratos filtrados, sendo efetuadas leituras em espectrofotômetro (663 e 645 para clorofila total) seguindo a metodologia de Witham et al. (1971) e Meschede et al. (2011).

Na colheita, foram computadas as espigas da área útil das parcelas, determinando-se o número de espigas por planta (PROL). Foram separadas aleatoriamente dez espigas de cada parcela, para avaliar o número de fileiras de grãos por espiga (NFE), o número de grãos por fileira (NGF) e o número de grãos por espiga (NGE). A massa de 1000 grãos, expressa em gramas, foi determinada após a debulha das espigas de cada parcela útil, de acordo com Brasil (2009).

A produtividade de grãos foi obtida por meio da pesagem dos grãos colhidos na área útil da parcela experimental, com umidade corrigida para 13,0% (umidade de armazenamento para grãos de milho) e ajuste dos dados para kg ha^{-1} . O teor de N dos grãos foi determinado segundo Miyazawa (1992).

Os resultados foram submetidos à análise de normalidade, homogeneidade e de variância. As médias, quando detectados efeitos significativos, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos significativos isolados para Inoculação e Híbridos foram observados em diferentes características avaliadas nos dois ambientes de cultivo (Tabela 5.2). Interação significativa entre Inoculações e Híbridos (INO x HIB) foi observada apenas para número de grãos por fileira em Faxinal. Portanto, as características fitométricas e desempenho produtivo do milho não foram alteradas pela interação entre genótipos de milho e inoculações, demonstrando que os híbridos apresentam um comportamento similar, independentemente da inoculação ou coinoculação com *Azospirillum* e *Anabaena*, o que sugere que a inoculação não apresenta resposta específica para cada genótipo.

Tabela 5.2 Resumo da análise de variância (p) das características fitométricas, componentes de produção e produtividade de grãos de híbridos de milho em resposta a inoculação e coinoculação de cianobactéria com *Azospirillum brasilense*. Londrina e Faxinal PR, 2017.

Var.	Inoculantes		Híbridos		INO x HIB		Erro		CV (%)	
	Londrina	Faxinal	Londrina	Faxinal	Londrina	Faxinal	Londrina	Faxinal	Londrina	Faxinal
AP	0,64	0,12	0,00	0,43	0,98	0,98	146,77	257,75	6,08	7,67
AIE	0,55	0,17	0,16	0,36	0,97	0,95	41,24	55,59	6,68	7,25
DC	0,24	0,05	0,06	0,44	0,94	0,73	1,77	3,64	6,08	10,28
IAF	0,09	0,06	0,02	0,59	0,69	0,90	11,56	10,87	12,87	16,18
Chl	0,36	0,02	0,66	0,58	0,99	0,99	97,54	96,29	22,39	20,87
N	0,00	0,00	0,51	0,86	0,90	0,54	6,05	7,08	8,25	10,82
P	0,03	0,01	0,22	0,87	0,79	0,96	0,06	0,18	11,51	15,69
K	0,09	0,07	0,53	0,68	0,64	0,14	3,7	3,34	7,96	7,07
NF	0,94	0,25	0,06	0,28	0,69	0,40	1,18	0,95	6,22	5,89
NGF	0,13	0,09	0,00	0,17	0,79	0,02	6,54	9,17	6,72	9,28
GE	0,43	0,13	0,00	0,32	0,81	0,18	6911,82	11377,33	11,85	18,09
PROL	0,99	0,46	0,51	0,62	0,97	0,90	0,02	3,42	15,14	3,78
NG	0,01	0,08	0,00	0,87	0,75	0,88	0,84	2,08	7,09	11,89
MMG	0,05	0,03	0,00	0,00	0,98	0,93	573,2	509,46	7,97	7,49
PROD	0,05	0,00	0,30	0,37	0,94	0,38	1030572,98	1539830,99	9,37	14,49

Altura de planta (AP), altura de inserção da espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), índice de área foliar (IAF). Clorofila (Chl), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K). Número de fileiras de grãos por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF), número de grãos por espiga (NGE), número de espigas por planta (PROL), Massa de 1000 grãos (MMG), Produtividade (PROD), teor de Nitrogênio dos grãos (NG). Inoculantes (INO), Híbridos (HIB). Coeficiente de variação (CV).

Fonte: o próprio autor.

As características fitométricas e os componentes de produção dos híbridos de milho em resposta aos níveis de inoculação são apresentadas na tabela 5.3. Em Londrina, a coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* resultou em maiores teores de N foliar, P foliar e massa de mil grãos que o tratamento controle. As inoculações isoladas apresentaram resultados intermediários, sem diferirem dos demais tratamentos. A inoculação e coinoculação com a cianobactéria (AC e AC+AB) resultaram em maiores teores de N nos grãos (NG), diferindo do *Azospirillum brasilense* (AB) e do tratamento controle (CTRL) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Características fitométricas e componentes de produção de híbridos de milho em resposta à inoculação e coinoculação de cianobactéria com *Azospirillum brasilense*, média de quatro híbridos. Londrina e Faxinal PR, 2017.

LONDRINA						
	DC	CHL	N	P	MMG	NG
	mm	mg g ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g	g kg ⁻¹
AC+AB	22,42 ^{ns}	43,57 ^{ns}	31,40 a	2,30 a	311,25 a	13,51 a
AC	21,98 ^{ns}	47,71 ^{ns}	29,42 ab	2,13 ab	302,65 ab	13,17 ab
AB	21,79 ^{ns}	43,59 ^{ns}	30,17 ab	2,16 ab	299,68 ab	12,61 b
CTRL	21,45 ^{ns}	41,57 ^{ns}	28,16 b	2,04 b	287,95 b	12,54 b
FAXINAL						
AC+AB	18,91 ab	52,99 a	27,47 a	2,91 a	313,34 a	12,54 ^{ns}
AC	19,32 a	47,65 ab	24,62 b	2,79 ab	302,94 ab	12,63 ^{ns}
AB	18,56 ab	45,36 ab	23,85 b	2,57 ab	300,67 ab	11,97 ^{ns}
CTRL	17,50 b	42,11 b	22,38 b	2,44 b	289,15 b	11,45 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns=não significativo. Diâmetro do colmo (DC), Clorofila (CHL), Nitrogênio (N), Fósforo (P). Massa de 1000 grãos (MMG), teor de Nitrogênio nos grãos (NG). *Anabaena cylindrica*+*Azospirillum brasilense* (AC+AB), *Anabaena cylindrica* (AC), *Azospirillum brasilense* (AB), Tratamento controle (CTRL).

Fonte: o próprio autor.

Em Faxinal, a inoculação com a cianobactéria (AC) favoreceu o diâmetro do colmo (DC), em relação ao controle. Para o N foliar destacou-se a coinoculação AC+AB, em relação aos demais. A coinoculação AC+AB também proporcionou maiores teores de clorofila (CHL), P e MMG, diferindo-se do controle (Tabela 5.3). A inoculação apenas com *Azospirillum* não alterou o conteúdo de clorofila das plantas,

corroborando os resultados relatados por Bashan et al. (2014) e Longhini et al. (2016).

Pandolfo et al. (2015), estudando o efeito da inoculação das sementes de milho e trigo com a bactéria *Azospirillum brasilense*, não obtiveram resposta em parâmetros como diâmetro de colmo, altura de inserção da espiga, altura de planta e índice de área foliar. O maior diâmetro do colmo está diretamente relacionado com a tolerância ao acamamento e o aumento da produção, atuando no armazenamento de sólidos solúveis que serão utilizados posteriormente para a formação dos grãos, especialmente se algum estresse comprometer a taxa de produção e translocação de fotoassimilados durante a fase de enchimento de grãos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Sarig et al. (1988) e Galindo et al. (2016) mostraram que a inoculação com *Azospirillum* aumentou a porcentagem de N e P nas folhas de trigo e milho. Similarmente, a aplicação de cianobactérias como inoculante ajuda na absorção de macro e micronutrientes, favorecendo as comunidades microbianas na rizosfera de híbridos de milho, com grande economia de fertilizantes químicos (PRASANNA et al., 2015; PRASANNA et al., 2016).

Em trabalho efetuado por Hungria et al. (2010) e (LONGHINI et al., 2016) na inoculação na cultura do milho com *A. brasilense*, os autores mencionam o aumento dos teores de N, P e K nas folhas, sugerindo a maior eficiência de uso de fertilizantes químicos. De igual maneira, Ghazal et al. (2013) relatam que a aplicação de cianobactérias como inoculantes no milho quando comparada com outros fertilizantes minerais reduzem a poluição ambiental.

Hungria et al. (2010), em ensaios com a inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*, não observaram aumentos do conteúdo de N nos grãos de milho, corroborando os dados obtidos para o tratamento apenas com *A. brasilense*. Entretanto, a coinoculação deste microrganismo com *A. cylindrica* resultou em maior teor de N no grão em Londrina (Tabela 5.3), ressaltando em maior eficiência de aproveitamento do N aplicado por efeito da cianobactéria.

Cavallet et al. (2000), estudando a inoculação à base de *Azospirillum* spp. com doses de nitrogênio na cultura do milho, mencionam que não houve efeitos sobre o número de fileiras de grãos por espiga, resposta semelhante à obtida na presente pesquisa (Tabela 5.3).

Os efeitos dos híbridos nas características fitométricas e componentes de produção, média de quatro níveis de inoculação, são apresentados na tabela 5.4. Em Londrina, o híbrido 2B810PW (HIB3) apresentou maior altura de plantas, índice de área foliar (IAF) e número de grãos por fileira (NGF) que os híbridos 512PW (HIB1) e 2A620PW (HIB2). Entretanto, para a massa de mil grãos (MMG), o HIB3 obteve o menor valor, diferindo dos demais híbridos. O híbrido 512PW (HIB1) apresentou maior teor de NG, diferindo estatisticamente do HIB3.

Em Faxinal, a única variável que apresentou diferenças entre híbridos foi MMG, com comportamento semelhante ao obtido em Londrina, sendo o HIB3 com menor massa de grãos (270,59 g), diferindo dos demais, devido ao maior NGF e NGE.

Tabela 5.4 Características fitométricas e componentes de produção de diferentes híbridos de milho, média de quatro níveis de inoculação. Londrina e Faxinal PR, 2017.

HÍBRIDOS LONDRINA						
	AP	IAF	NGF	NGE	MMG	NG
	cm	m²/m²	número		g	g kg⁻¹
512PW (HIB1)	194,68 bc	8,76 ab	38,55 ab	730,00 a	300,91 a	13,50 a
2A620PW (HIB2)	191,50 c	8,08 b	36,75 b	638,00 b	313,41 a	12,99 ab
2B810PW (HIB3)	206,94 a	9,34 a	40,00 a	789,25 a	269,68 b	12,26 b
Status Viptera 3 (HIB4)	204,48 ab	9,03 ab	36,75 b	648,00 b	317,52 a	13,08 ab
HÍBRIDOS FAXINAL						
512PW (HIB1)	209,58 ^{ns}	6,59 ^{ns}	31,50 ^{ns}	604,00 ^{ns}	302,87 a	11,99 ^{ns}
2A620PW (HIB2)	206,76 ^{ns}	6,70 ^{ns}	32,50 ^{ns}	570,75 ^{ns}	313,04 a	12,39 ^{ns}
2B810PW (HIB3)	206,34 ^{ns}	6,78 ^{ns}	32,75 ^{ns}	623,25 ^{ns}	270,59 b	12,16 ^{ns}
Status Viptera 3 (HIB4)	214,80 ^{ns}	7,10 ^{ns}	33,75 ^{ns}	560,25 ^{ns}	319,60 a	12,07 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns=não significativo. Altura de planta (AP), índice de área foliar (IAF), número de grãos por fileira (NGF), número de grãos por espiga (NGE), massa de 1000 grãos (MMG), nitrogênio dos grãos (NG).

Fonte: o próprio autor.

Silva Libório (2016), em trabalho com híbridos de milho com inoculação a base de *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada, menciona que o efeito do inoculante não altera a altura de planta e altura de inserção da espiga, corroborando os resultados aqui obtidos. Resultados contrários foram publicados por Maquibela et al. (2009) e Prasanna et al. (2016), usando cianobactérias como

inoculantes no milho, resultando em diferenças significativas no crescimento das plantas.

O clima e o tipo de solo interferem na adaptação das bactérias inoculadas, o que pode acarretar em variação nos resultados de inoculação, dependendo da localização geográfica (DÖRR DE QUADROS et al., 2014). Isso pode explicar diferenças em Londrina e Faxinal tanto na resposta às inoculações quanto aos híbridos, uma vez que a média anual de temperatura difere de 2,6 graus entre os locais, sendo em Londrina 20.9 °C e Faxinal de 18.3 °C.

Apenas em Faxinal foi observada interação Inoculante x Híbrido para número de grãos por fileira (Tabela 5.5). No HIB1 a coinoculação resultou em maior número de grãos por fileira em relação ao controle, sem diferir das inoculações. Nos HIB2 e HIB4 não houve diferenças entre as inoculações. No HIB3, a coinoculação AC+AB e a inoculação com AC, apresentaram em média 35 grãos por fileira, superando a inoculação com AB (29 grãos).

Tabela 5.5 Desdobramento da interação para número de grãos por fileira em resposta a inoculação e coinoculação de cianobactéria com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e desempenho produtivo de híbridos de milho. Londrina e Faxinal PR, 2017.

FAXINAL				
Número de grãos por fileira				
INO \ HIB	HIB1	HIB2	HIB3	HIB4
AC+AB	36,00 aA	31,00 aA	35,00 aA	34,00 aA
AC	31,00 aAB	35,00 aA	35,00 aA	33,00 aA
AB	30,00 abAB	33,00 abA	29,00 bB	36,00 aA
CTRL	29,00 aB	31,00 aA	32,00 aAB	32,00 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. *Anabaena cylindrica* + *Azospirillum brasilense* (AC+AB), *Anabaena cylindrica* (AC), *Azospirillum brasilense* (AB), Tratamento controle (CTRL). 512PW (HIB1), 2A620PW (HIB2), 2B810PW (HIB3), Status Viptera 3 (HIB4). Inoculantes (INO), Híbridos (HIB).

Fonte: o próprio autor.

Nas inoculações AC+AB, AC e CTR não foram observadas diferenças entre os híbridos. A inoculação com AB, o HIB4 resultou em maior número de grãos por fileira que o HIB3. Conforme relatado por Naseri et al. (2013), a coinoculação de duas bactérias diazotróficas, *Azotobacter* e *Azospirillum*, resultou no incremento dos

grãos de milho por fileira, possivelmente devido à produção de compostos promotores como auxinas e giberelinas.

Foram constatados efeitos dos inoculantes na produtividade de grãos, com maiores valores em Londrina quando aplicada a coinoculação com AC+AB e, em Faxinal, com a inoculação (AC) e a coinoculação (AC+AB) (Tabela 5.6). Em ambos locais não houve diferenças de produtividade entre os híbridos de milho. A coinoculação de AC+AB resultou em incremento de 967 kg ha⁻¹ (9,37%) em Londrina e de 1744 kg ha⁻¹ (23,1%) em Faxinal.

Tabela 5.6: Produtividade e incremento de produtividade de grãos (kg ha⁻¹ e em %) em resposta à inoculação e coinoculação de cianobactéria com *Azospirillum brasilense* em diferentes híbridos de milho. Londrina e Faxinal PR, 2017.

INO	HIB	HIB1	HIB2	HIB3	HIB4	Média	HIB1	HIB2	HIB3	HIB4	Média
		Incremento grãos (kg ha ⁻¹) Londrina					Incremento grãos (kg ha ⁻¹) Faxinal				
AC+AB		10796 ^{ns}	10817 ^{ns}	11437 ^{ns}	12035 ^{ns}	11271A	8903 ^{ns}	8465 ^{ns}	9387 ^{ns}	10510 ^{ns}	9316A
AC		10884 ^{ns}	10899 ^{ns}	11431 ^{ns}	10899 ^{ns}	11028AB	8548 ^{ns}	9644 ^{ns}	9418 ^{ns}	8006 ^{ns}	8904A
AB		10730 ^{ns}	10746 ^{ns}	10771 ^{ns}	10705 ^{ns}	10738AB	8271 ^{ns}	8382 ^{ns}	8850 ^{ns}	8310 ^{ns}	8453AB
CTRL		9958 ^{ns}	9871 ^{ns}	10718 ^{ns}	10672 ^{ns}	10305B	6892 ^{ns}	7479 ^{ns}	7989 ^{ns}	7930 ^{ns}	7573B
Média		10592 ^{ns}	10583 ^{ns}	11089 ^{ns}	11078 ^{ns}		8154 ^{ns}	8492 ^{ns}	8911 ^{ns}	8689 ^{ns}	
Incremento de grãos em relação ao controle											
		(kg ha⁻¹)(%) Londrina					(kg ha⁻¹)(%) Faxinal				
AC+AB		838(8)	947(10)	718(7)	1363(13)	967(9)	2011(29)	985(13)	1398(17)	2580(33)	1744(23)
AC		926(9)	1029(10)	713(7)	228(2)	724(7)	1657(24)	2164(29)	1429(18)	76(1)	1332(18)
AB		772(8)	875(9)	53(0,50)	33(0,30)	433(4)	1380(20)	903(12)	860(11)	380(5)	881(12)
Média		845(8)	950(10)	495(5)	541(5)		1683(24)	1351(18)	1229(15)	1012(13)	

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns=não significativo. 512PW (HIB1), 2A620PW (HIB2), 2B810PW (HIB3), Status Viptera 3 (HIB4). *Anabaena cylindrica*+*Azospirillum brasilense* (AC+AB), *Anabaena cylindrica* (AC), *Azospirillum brasilense* (AB), Tratamento controle (CTRL).

Fonte: o próprio autor.

Díaz-Zorita et al. (2015) evidenciaram, em vários estudos de campo, principalmente na América Latina e na Ásia, o aumento na produtividade de grãos de culturas inoculadas com *Azospirillum sp.*, principalmente em cereais. Revisaram 47 artigos descrevendo 347 casos de respostas de produção de grãos para a aplicação de diversos inoculantes com *Azospirillum sp.* em 12 países. Observaram que a maioria dos estudos foi realizado em culturas de cereais (86,7%),

principalmente milho irrigado. Entre todas as culturas relatadas, a resposta média à inoculação com *Azospirillum* sp. foi de 10,0% de aumento na produção de grãos, com maiores rendimentos para cereais de inverno (14,0%) do que de verão (9,5%) ou leguminosas (6,6%). No presente trabalho, a coinoculação com *Anabaena cylindrica* resultou em maiores aumentos de produtividade que os mencionados por esses autores.

Dörr De Quadros et al. (2014), em estudo realizado sobre o desempenho agrônomico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*, relataram que as bactérias inoculadas permaneceram em quantidade viável nas raízes até o final do ciclo da cultura, demonstrando sobrevivência pós inoculação. Para algumas características agrônômicas, os autores relataram que a resposta do milho à inoculação depende do híbrido testado.

A inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* teve efeito positivo sobre as características de rendimento e produtividade do milho, independentemente da estação de crescimento e do híbrido utilizado (BRUM et al., 2016). Neste estudo, embora não tenha diferido estatisticamente do controle, o *Azospirillum* proporcionou aumentos de 4,36 e 11,91% na produtividade de grãos em Londrina e Faxinal, respectivamente.

Pesquisas divergem quanto às respostas anteriormente mencionadas e obtidas no presente trabalho ao mencionar que a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* não aumenta o rendimento de grãos e não altera a massa de mil grãos (PANDOLFO et al., 2015). Sangoi et al. (2015) também relatam que o tratamento de sementes com *Azospirillum* não contribuiu para aumentar o rendimento de grãos de milho, independentemente do sistema de manejo e da dose de nitrogênio mineral aplicada.

Prasanna et al. (2016), avaliando o rendimento de grãos de milho, não encontraram efeitos da inoculação com cianobactérias em relação ao controle. Entretanto, em nosso estudo, a aplicação isolada de *Anabaena cylindrica* resultou em aumentos de 7,13 e 17,96%, o que representa 724 e 1332 kg ha⁻¹ em relação ao controle, em Londrina e Faxinal, respectivamente. Foram ainda encontrados diferentes comportamentos das características fitométricas, nutricionais e de produção de milho, independente dos híbridos estudados, com destaque, na maioria das variáveis estudadas, para o tratamento da coinoculação entre *Anabaena*

cylindrica com *Azospirillum brasilense*, o que demonstra o grande potencial de uso desses microrganismos para maior desenvolvimento e produção da cultura de milho.

5.6 CONCLUSÕES

A inoculação e coinoculação da cianobactéria *Anabaena cylindrica* e da bactéria *Azospirillum brasilense* favorecem o desenvolvimento e o desempenho produtivo do milho, independentemente do híbrido

A coinoculação AC+AB incrementou a produtividade em 967 kg ha⁻¹ (9,37%) em Londrina e em 1744 kg ha⁻¹ (23,1%) em Faxinal em relação ao controle.

Os híbridos de milho estudados apresentaram resposta similar independente da inoculação ou coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Anabaena cylindrica*, o que sugere que a inoculação não apresenta resposta específica do genótipo de milho.

6 CONCLUSÃO

As cianobactérias, microrganismos procarióticos fotossintetizantes, têm a capacidade de fixar o N₂ atmosférico pelo processo da fixação biológica e efeitos na promoção de crescimento, entretanto, são pouco estudadas como inoculantes para as plantas.

As cianobactérias *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp., *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima* apresentaram crescimento diferenciado *in vitro* em meio de cultura BG11 sem N suplementado com extrato de levedura, até o quinto dia.

Nostoc muscorum e *Anabaena cylindrica*, independentemente dos meios de cultura em que foram crescidas, tiveram efeitos no desenvolvimento inicial de plântulas de milho na maioria das variáveis avaliadas em câmara de crescimento.

Em avaliações fitométricas em casa de vegetação, para diâmetro do colmo as quatro cianobactérias isoladamente responderam melhor que *A. brasilense* e o controle. Para a massa foliar, *Nostoc muscorum* foi a melhor. As cianobactérias associadas a *Azospirillum brasilense* têm alto potencial para favorecer a cultura do milho, pelo aumento da massa e volume radicular, assim como o incremento da massa e área foliar, demonstrando que a coinoculação entre *Anabaena cylindrica* e *Azospirillum brasilense* tem grande potencial para a cultura de milho.

As características fitométricas e desempenho produtivo do milho variedade IPR164, avaliadas em duas safras em campo, não foram alteradas pela interação entre doses de N e inoculantes a partir de *Anabaena cylindrica* e *Nostoc muscorum*, demonstrando que as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias. A inoculação com *Anabaena cylindrica* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo do milho e resultou em incremento na produtividade de grãos em 912 kg ha⁻¹ (20,46%) na safra 1 e de 1020 kg ha⁻¹ (21,11%) na safra 2, em relação ao controle.

A coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* favoreceu o desenvolvimento e o desempenho produtivo de híbridos de milho com incremento de 967 kg ha⁻¹ (9,37%) em Londrina e 1744 kg ha⁻¹ (23,1%) em Faxinal, em relação ao controle não inoculado. Em relação aos híbridos de milho, estes apresentaram o mesmo comportamento, independentemente da inoculação ou coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Anabaena cylidrica*, sugerindo resposta independente do genótipo

Assim, se faz necessário estabelecer mais pesquisas aplicando cianobactérias como inoculante nas sementes do milho, em diferentes genótipos e condições edafoclimáticas, para tornar-se futuramente uma tecnologia recomendada favorecendo tanto o pequeno quanto o grande produtor.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-12, 2009. ISSN 1365-2672.
- ADIAHA, M.; AGBA, O.; ATTOE, E.; OJIKPONG, T.; KEKONG, M.; OBIO, A.; UNDIE, U. Effect of Maize (*Zea mays* L.) on Human Development and the Future of Man-maize Survival: A Review. **World Scientific News**, n. 59, p. 52-62, 2016. ISSN 2392-2192.
- ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. 2006. ISSN 0044-5967.
- ALLISON, F. E.; HOOVER, S. R.; MORRIS, H. J. Physiological studies with the nitrogen-fixing alga, *Nostoc muscorum*. **Botanical Gazette**, v. 98, n. 3, p. 433-463, 1937. ISSN 0006-8071.
- ALVA, A.; PARAMASIVAM, S.; FARES, A.; DELGADO, J.; MATTOS JR, D.; SAJWAN, K. Nitrogen and irrigation management practices to improve nitrogen uptake efficiency and minimize leaching losses. **Journal of Crop Improvement**, v. 15, n. 2, p. 369-420, 2006. ISSN 1542-7528.
- AMADO, T.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, 2002. ISSN 0100-0683.
- AMADO, T.; MIELNICZUK, J.; FERNANDES, S. Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 179-189, 2000. ISSN 0100-0683.
- ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. D.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1643-1651, 2003. ISSN 1981-1829.
- ANDRADE, D.; COLOZZI FILHO, A. Microalgae of continental waters Volume 2: production of biomass and co-products. **Microalgas de águas continentais volume 2: produção de biomassa e coprodutos**, 2014. ISSN 8588184494.
- ANDRADE, D.; HAMAKAWA, P.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão**, 1994.
- ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MILHO CRIOULO. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002. ISSN 0103-9016.

ARAUJO, S. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Rev. Inf. Agron**, v. 122, p. 4-6, 2008. ISSN 2311-5904.

ARGENTA, G.; SANGOI, L. Arranjo de plantas em milho: análise do estado-da-arte. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, 2001. ISSN 0103-8478.

BARBOSA, T. **Cianobacterias tóxicas e processos de remoção**: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2009.

BARROS, J. F.; CALADO, J. G. A cultura do milho. 2014.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014. ISBN 1439867321.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014. ISSN 0032-079X.

BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1938-1945, 1995. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/61/5/1938.full.pdf> >.

BENEMANN, J. R.; WEARE, N. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. **Science**, v. 184, n. 4133, p. 174-175, 1974. ISSN 0036-8075.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 831-839, 2004. ISSN 1678-3921.

BERGMAN, B.; RAI, A.; RASMUSSEN, U. Cyanobacterial associations. In: (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**: Springer, 2007. p.257-301. ISBN 978-1-4020-3546-3.

BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. **La fenología del maíz**. 1993

BRASIL. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Brasília: Mapa/ACS**, p. 399, 2009. ISSN 978-85-99851-70-8.

BRUM, M. D. S.; CUNHA, V. D. S.; STECCA, J. D. L.; GRANDO, L. F. T.; MARTIN, T. N. Components of corn crop yield under inoculation with *Azospirillum brasilense* using integrated crop-livestock system. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 485-492, 2016. ISSN 1807-8621.

CAMPOS, B.-H. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante" graminante" na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000. ISSN 1678-4596.

CAVALLET, L.; PESSOA, A. D. S.; HELMICH, J.; HELMICH, P.; OST, C. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000. ISSN 1415-4366.

CELLA, D.; DE LIMA ROSSI, M. C. Análise do mercado de fertilizantes no Brasil. **Revista Interface Tecnológica**, v. 7, n. 1, p. 10, 2010. ISSN 2447-0864.

CHIBEBA, A. M.; FÁTIMA GUIMARÃES, M.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1641, 2015. ISSN 2158-2742.

COELHO, A. M. C. **Manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2007.

CRUZ, J. C. C.; ALVARENGA, R.; NOVOTNY, E.; PEREIRAFILHO, I.; SANTANA, D.; PEREIRA, F.; HERNANI, L. **Cultivo do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

CRUZ, S. C.; PEREIRA, F. D. S.; SANTOS, J. R.; ALBUQUERQUE, A. D.; PEREIRA, R. G. Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio direto, no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 62-68, 2008. ISSN 1415-4366.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 17, n. 10, 2013. ISSN 1415-4366.

DEMÉTRIO, C. S.; FORNASIERI FILHO, D.; CAZETTA, J. O.; CAZETTA, D. A. Desempenho de híbridos de milho submetidos a diferentes espaçamentos e densidades populacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 1691-1697, 2008. ISSN 0100-204X.

DETONI, M. J.; SARTOR, L. R.; GASPERINI, A. M.; OLIGINI, K. F.; FRIGOTTO, T. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and nitrogen doses in maize for grain production. **Científica**, v. 45, n. 3, p. 321-324, 2017. ISSN 1984-5529.

DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, O. Á.; BERGER, A.; SATORRE, E. H. Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with *Azospirillum* sp. In: (Ed.). **Handbook for Azospirillum**: Springer, 2015. p.435-445. ISBN 978-3-319-06542-7.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003. ISSN 0735-2689.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. C. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995. ISBN 8585007656.

DODDS, W. K.; GUDDER, D. A.; MOLLENHAUER, D. The ecology of *Nostoc*. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 1, p. 2-18, 1995. ISSN 1529-8817.

DOMMERGUES, Y.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, G. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 83-89, 1973. ISSN 0038-0717.

DÖRR DE QUADROS, P.; WURDIG ROESCH, L. F.; RÉGIS FERREIRA DA SILVA, P.; MACEDO VIEIRA, V.; DINAEL ROEHRS, D.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, 2014. ISSN 0034-737X.

DOWSELL, C. R.; PALIWAL, R. L.; CANTRELL, R. P. **Maize in the third world**. Westview Press, 1996. ISBN 0813389631.

DRESSLER, R. L. The pre-Columbian cultivated plants of Mexico. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 16, n. 6, p. 115-172, 1953. ISSN 0006-8098.

DUAN, Y.; XU, M.; GAO, S.; YANG, X.; HUANG, S.; LIU, H.; WANG, B. Nitrogen use efficiency in a wheat–corn cropping system from 15 years of manure and fertilizer applications. **Field Crops Research**, v. 157, p. 47-56, 2014. ISSN 0378-4290.

DUCHOUD, F.; CHUANG, D. S.; LIAO, J. C. Cyanobacteria as a Host Organism. **Industrial Biotechnology: Microorganisms**, p. 581-604, 2017. ISSN 3527807799.

EMBRAPA, E. B. D. P. A. Sistemas de Produção Embrapa: Cultivo do Milho. 2015. ISSN 1679-012X. Disponível em: <
https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema_sdeproducaolf6_1qa1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7905&p_r_p_-996514994_topicold=8658>. Acesso em: 04/10/2017.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISCHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 45-49, 1988. ISSN 0038-0717.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. **Guaíba: Agropecuária**, v. 18, p. 360, 2000.

FAY, P. Cell differentiation and pigment composition in *Anabaena cylindrica*. **Archives of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 62-70, 1969. ISSN 0302-8933.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. ISSN 1413-7054.

FERREIRA GOMES, R.; GUERRA DA SILVA, A.; LARA DE ASSIS, R.; RIBEIRO PIRES, F. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres

agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 5, 2007. ISSN 0100-0683.

FLEMING, H.; HASELKORN, R. Differentiation in *Nostoc muscorum*: nitrogenase is synthesized in heterocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 10, p. 2727-2731, 1973. ISSN 0027-8424.

FLORES, E.; HERRERO, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 39, 2010. ISSN 1740-1526.

FONSECA, I. A.; RODRIGUES, L. Cianobactérias perifíticas em dois ambientes lênticos da planície de inundação do alto Rio Paraná, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 821-834, 2005. ISSN 1806-9959.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Funep, 2007. ISBN 8578050061.

FRANCIS, C.; RUTGER, J.; PALMER, A. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 537-539, 1969. ISSN 0011-183X.

FRANCO, A.; BALIEIRO, F. D. C.; SIQUEIRA, J.; MOREIRA, F.; LOPES, A.; GUILHERME, L.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.; CARVALHO, J. Fixação biológica de nitrogênio alternativa aos fertilizantes nitrogenados. **Inter-relações fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**, 1999.

FREITAS, F. D. O. As expansões do milho-*Zea mays*, L.-para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA antigo de amostras arqueológicas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2002.

FUKAMI, J.; ABRANTES, J. L. F.; DEL CERRO, P.; NOGUEIRA, M. A.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Archives of Microbiology**, p. 1-10, 2017. ISSN 0302-8933.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016. ISSN 2191-0855.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; NOGUEIRA, L. M.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTTE, J. L. M. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 2016. ISSN 0100-0683.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; TARSITANO, M. A. A.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ALVES, C. J.; ARF, O. Economic analysis of corn inoculated with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen

sources and doses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1749-1764, 2017. ISSN 1679-0359.

GALON, L.; TIRONI, S. P.; DA ROCHA, A. A.; SOARES, E. R.; CONCENÇO, G.; ALBERTO, C. M. Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 3, 2011. ISSN 1982-4831.

GHAZAL, F.; EL-KOOMY, M.; ABDEL-KAWI, K.; SOLIMAN, M. Impact of cyanobacteria, humic acid and nitrogen levels on maize (*Zea mays* L.) yield and biological activity of the rhizosphere in sandy soils. **Journal of American Science**, v. 9(2) 46-55, p. 10, 2013. ISSN1545-1003.

GOES MACIEL, C. D.; ZOBIOLE, L. H. S.; SOUZA, J. I.; HIROOKA, E.; LIMA, L. G. N. V.; SOARES, C. R. B.; PIVATTO, R. A. D.; FUCHS, G. M.; HELVIG, E. O. Eficácia do herbicida Haloxypop R (GR-142) isolado e associado ao 2, 4-D no controle de híbridos de milho RR® voluntário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 2, p. 112-123, 2013. ISSN 2236-1065.

GOLOUBINOFF, P.; PÄÄBO, S.; WILSON, A. C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an Adh2 gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1997-2001, 1993. ISSN 0027-8424.

GRZESIK, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z. Improvements in Germination, Growth, and Metabolic Activity of Corn Seedlings by Grain Conditioning and Root Application with Cyanobacteria and Microalgae. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, n. 4, 2014. ISSN 1230-1485.

GUIMARAES, D. P.; SANS, L. M. A.; MORAES, A. D. C. Estimativa da área foliar de cultivares de milho. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2002, In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis, SC. Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo:[resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Florianópolis: Epagri, 2002.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. **Algal research**, v. 2, n. 2, p. 79-97, 2013. ISSN 2211-9264.

HABIB, K.; KUMAR, S.; MANIKAR, N.; ZUTSHI, S.; FATMA, T. Biochemical effect of carbaryl on oxidative stress, antioxidant enzymes and osmolytes of cyanobacterium *Calothrix brevissima*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 87, n. 6, p. 615-620, 2011. ISSN 0007-4861.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T. M. R.; SCHJØRRING, J. K.; MØLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: (Ed.). **Marschers's Mineral Nutrition of Higher Plants**: Elsevier Science, 2012. p.135-189. ISBN 0123849055.

HIRSCHBERG, J.; CHAMOVITZ, D. Carotenoids in cyanobacteria. In: (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**: Springer, 1994. p.559-579. ISBN 978-94-011-0227-8.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010. ISSN 0306-2619.

HUNGRIA; FRANCHINI, J.; CAMPO, R.; GRAHAM, P. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**: Springer, 2005. p.25-42. ISBN 978-1-4020-3544-9.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. D. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010. ISSN 0032-079X.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.; MENDES, I.; CAMPO, R.; GRAHAM, P. Inoculant preparation, production and application. In: (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**: Springer, 2005. p.223-253. ISBN 978-1-4020-3542-5.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013. ISSN 0178-2762.

_____. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium spp.* and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 06, p. 811, 2015. ISSN 2158-2742.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 221, p. 125-131, 2016. ISSN 0167-8809.

ITOU, Y.; OKADA, S.; MURAKAMI, M. Two structural isomeric siderophores from the freshwater cyanobacterium *Anabaena cylindrica* (NIES-19). **Tetrahedron**, v. 57, n. 44, p. 9093-9099, 2001. ISSN 0040-4020.

IVERSEN, M.; GRØNSBERG, I. M.; VAN DEN BERG, J.; FISCHER, K.; AHETO, D. W.; BØHN, T. Detection of transgenes in local maize varieties of small-scale farmers

in Eastern Cape, South Africa. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e116147, 2014. ISSN 1932-6203.

JAFFE, D. A. 12 The Nitrogen Cycle. **International Geophysics**, v. 50, p. 263-284, 1992. ISSN 0074-6142.

JÄGER, K.; BARTÓK, T.; ÖRDÖG, V.; BARNABÁS, B. Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 511-516, 2010. ISSN 0254-6299.

JAKUBOWSKA, N.; SZELAĞ-WASIELEWSKA, E. Toxic picoplanktonic cyanobacteria. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1497-1518, 2015. ISSN 1660-3397.

JAMA, B.; KIMANI, D.; HARAWA, R.; MAVUTHU, A. K.; SILESHI, G. W. Maize yield response, nitrogen use efficiency and financial returns to fertilizer on smallholder farms in southern Africa. **Food Security**, p. 1-17, 2017. ISSN 1876-4517.

JEFFREY, S. T.; HUMPHREY, G. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c 1 and c 2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191-194, 1975. ISSN 0015-3796.

KANEKO, F. H.; SABUNDJIAN, M. T.; ARF, O.; LEAL, A. J. F.; CARNEIRO, L. F.; PAULINO, H. B. ANÁLISE ECONÔMICA DO MILHO EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum*, FONTES E DOSES DE N EM COBERTURA. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 202-216, 2016. ISSN 1980-6477.

KAPPES, C.; COSTA ANDRADE, J. A. D.; IWAMOTO HAGA, K.; FERREIRA, J. P.; ARF, M. V. Germinação, vigor de sementes e crescimento de plântulas de milho sob condições de déficit hídrico. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 2, 2010. ISSN 1519-1125.

KEENEY, D. R.; NELSON, D. Nitrogen—inorganic forms. **Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties**, n. methodsofsoilan2, p. 643-698, 1982. ISSN 0891182047.

KOLE, C. **Genome mapping and molecular breeding in plants**. Springer Heidelberg, 2007.

KONG, W.-B.; YANG, H.; CAO, Y.-T.; SONG, H.; HUA, S.-F.; XIA, C.-G. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 62-69, 2013. ISSN 1330-9862.

KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of diazotrophs and actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1074-1087, 2016. ISSN 0721-7595.

LABARRE, J.; THURIAUX, P.; CHAUVAT, F. Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 10, p. 4668-4673, 1987. ISSN 0021-9193.

LADHA, J.; TIROL-PADRE, A.; REDDY, C.; CASSMAN, K.; VERMA, S.; POWLSON, D.; VAN KESSEL, C.; RICHTER, D. D. B.; CHAKRABORTY, D.; PATHAK, H. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. **Scientific reports**, v. 6, p. 19355, 2016. ISSN 2045-2322.

LANA, M. A.; EULENSTEIN, F.; SCHLINDWEIN, S. L.; GRAEF, F.; SIEBER, S.; VON HERTWIG BITTENCOURT, H. Yield stability and lower susceptibility to abiotic stresses of improved open-pollinated and hybrid maize cultivars. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 37, n. 4, p. 30, 2017. ISSN 1774-0746.

LERAYER, R.; PATERNIANI, E.; SILVEIRA, J.; MENOSSI, M.; ODA, L.; DI CIERO, L. Avaliação de impactos do milho geneticamente modificado. **Conselho de Informações Sobre Biotecnologia (CIB) Disponível em:< Disponível em: http://www.cib.org.br/ctnbio/avaliacao_de_impactos_milho_CTNBIO1.pdf>. Acessado em**, v. 17, 2006.

LI, H.; JIANG, X. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, n. 2, p. 235-241, 2017. ISSN 1021-4437.

LI, T.; LI, C.-T.; BUTLER, K.; HAYS, S. G.; GUARNIERI, M. T.; OYLER, G. A.; BETENBAUGH, M. J. Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 55, 2017. ISSN 1754-6834.

LIRA-SALDIVAR, R.; HERNANDEZ, A.; VALDEZ, L.; CÁRDENAS, A.; IBARRA, L.; HERNÁNDEZ, M.; RUIZ, N. *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices* co-inoculation stimulates growth and yield of cherry tomato under shadehouse conditions. **Phyton-Int J Exp Bot**, v. 83, p. 133-138, 2014. ISSN 0031-9457.

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho BT: alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2002.

LONGHINI, V. Z.; SOUZA, W. C. R. D.; ANDREOTTI, M.; SOARES, N. D. A.; COSTA, N. R. INOCULATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA AND NITROGEN FERTILIZATION IN TOPDRESSING IN IRRIGATED CORN. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2, p. 338-347, 2016. ISSN 1983-2125.

LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. **Gayana. Botánica**, v. 60, n. 2, p. 83-89, 2003. ISSN 0717-6643.

MAGALHÃES, P.; DURÃES, F. Fisiologia da produção de milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica**, 2006.

MAGALHÃES, P. C. Fisiologia do milho. **CEP**, v. 35701, p. 970, 2002.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The scientific world journal**, v. 2012, 2012. ISSN 23566140.

MANGELSDORF, P. C. **Corn. Its origin, evolution and improvement**. Belknap Press of Harvard University Press, 1974. ISBN 0674171756.

MAQUBELA, M.; MNKENI, P.; ISSA, O. M.; PARDO, M.; D'ACQUI, L. *Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. **Plant and soil**, v. 315, n. 1-2, p. 79-92, 2009. ISSN 0032-079X.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; MARX, J.-C.; GERDAY, C. **Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology**. Springer, 2008. ISBN 3540743340.

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. D. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015. ISSN 0034-737X.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011. ISSN 0306-2619.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **Amb Express**, v. 5, n. 1, p. 71, 2015. ISSN 2191-0855.

MARTINS, F. A. D.; ANDRADE, A. T.; CONDÉ, A. B. T.; GODINHO, D. B.; CAIXETA, C. G.; COSTA, R. L.; POMELA, A. W. V.; SOARES, C. M. S. Avaliação de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, p. 103-110, 2012. ISSN 0104-9070.

MEINICKE NASCIMENTO, F.; BICUDO, S. J.; LANÇA RODRIGUES, J. G.; BARROS FURTADO, M.; CAMPOS, S. Produtividade de genótipos de milho em resposta à época de semeadura. **Revista Ceres**, v. 58, n. 2, 2011. ISSN 0034-737X.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A (b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011. ISSN 1678-3921.

MESCHEDE, D.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; SILVA, J. Alteração fisiológica da cana-de-açúcar pela aplicação de glyphosate e sulfometuron-methyl. **Planta Daninha**, p. 413-419, 2011. ISSN 0100-8358.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Regras para análise de sementes**: MAPA/ACS Brasília 2009.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F. de. **Análise química de tecido vegetal**. Londrina : IAPAR, 1992, 17 p. (IAPAR. Circular, 74).

MOHAN, A.; KUMAR, B.; NATH, D. Cyanobacterial consortium in the improvement of maize crop. **Int J Curr Microbiol Appl Sci**, v. 4, p. 264-274, 2015. ISSN 2319-7692.

MOON, M.; KIM, C. W.; PARK, W.-K.; YOO, G.; CHOI, Y.-E.; YANG, J.-W. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Algal Research**, v. 2, n. 4, p. 352-357, 2013. ISSN 2211-9264.

MURO-PASTOR, A. M.; BRENES-ÁLVAREZ, M.; VIOQUE, A. A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacteria. **Environmental Microbiology Reports**, 2017. ISSN 1758-2229.

NASERI, R.; MOGHADAM, A.; DARABI, F.; HATAMI, A.; TAHMASEBEI, G. R. The effect of deficit irrigation and *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on grain yield, yield components of maize (SC 704) as a second cropping in western Iran. **Bull Env Pharmacol Life Sci**, v. 2, p. 104-112, 2013. ISSN 2277-1808.

NEENAN, M.; SPILLANE, T.; O'SHEA, J. Maize for Silage. **Irish Journal of Agricultural Research**, p. 37-45, 1973. ISSN 0578-7483.

OHLAND, R. A. A.; SOUZA, L. D.; HERNANI, L. C.; MARCHETTI, M. E.; GONÇALVES, M. C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005. ISSN 1413-7054.

OREN, A.; VENTURA, S. The current status of cyanobacterial nomenclature under the “prokaryotic” and the “botanical” code. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-13, 2017. ISSN 0003-6072.

PANDOLFO, C. M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JÚNIOR, A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasiliense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecuária Catarinense**, v. 27, n. 3, p. 94-99, 2015. ISSN 2525-6076.

PATEL, V. K.; SUNDARAM, S.; PATEL, A. K.; KALRA, A. Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production. **Arabian Journal for Science and Engineering**, p. 1-13, 2017. ISSN 2193-567X.

PEIXOTO, C. D. M. O milho no Brasil, sua importância e evolução. **Seed News**, 2014.

PEREIRA-DEFILIPPI, L.; PEREIRA, E.; SILVA, F.; MORO, G. Expressed sequence tags related to nitrogen metabolism in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 2, 2017. ISSN 1676-5680.

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017. **Embrapa Milho e Sorgo-Documents (INFOTECA-E)**, 2016.

PRADO, W. S.; ESTEVÃO, W. L.; MAEDA, A. K. M.; CARLESSO, A.; GONÇALVES, M. C.; DAVIDE, L. M. C. Agronomic performance of transgenic and isogenic corn hybrids in the state of Mato Grosso do Sul. **Revista Ceres**, v. 63, n. 6, p. 796-806, 2016. ISSN 0034-737X.

PRASANNA, R.; HOSSAIN, F.; BABU, S.; BIDYARANI, N.; ADAK, A.; VERMA, S.; SHIVAY, Y. S.; NAIN, L. Prospecting cyanobacterial formulations as plant-growth-promoting agents for maize hybrids. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 32, n. 4, p. 199-207, 2015. ISSN 0257-1862.

PRASANNA, R.; KANCHAN, A.; RAMAKRISHNAN, B.; RANJAN, K.; VENKATACHALAM, S.; HOSSAIN, F.; SHIVAY, Y. S.; KRISHNAN, P.; NAIN, L. Cyanobacteria-based bioinoculants influence growth and yields by modulating the microbial communities favourably in the rhizospheres of maize hybrids. **European Journal of Soil Biology**, v. 75, p. 15-23, 2016. ISSN 1164-5563.

RADWAN, T. E.-S. E.-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004. ISSN 1678-3921.

RAI, A.; PANDEY, K.; KASHYAP, A. Heterocyst differentiation and polarity in *Calothrix*. **New Phytologist**, v. 81, n. 3, p. 647-651, 1978. ISSN 1469-8137.

RAIJ, B. V. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. IAC Campinas, 1996.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J. D.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, p. 214-226, 2013. ISSN 1980-6477.

RODRIGUES, L.; SILVA, P.; FERREIRA, P. Indicações técnicas para o cultivo do milho e do sorgo no Rio Grande do Sul: safras 2011/2012 e 2012/2013. **REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO**, v. 56, 2011.

RODRIGUES, R. A. F.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C. Co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* in common beans grown under two irrigation depths. **Revista Ceres**, v. 63, n. 2, p. 198-207, 2016. ISSN 0034-737X.

ROSALES-LOAIZA, N.; VERA, P.; AIELLO-MAZZARRI, C.; MORALES, E. COMPARATIVE GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FOUR

STRAINS OF *Nostoc* AND *Anabaena* (CYANOBACTERIA, NOSTOCALES) IN RELATION TO SODIUM NITRATE. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 347-354, 2016. ISSN 0120-548X.

ROSGAARD, L.; DE PORCELLINIS, A. J.; JACOBSEN, J. H.; FRIGAARD, N.-U.; SAKURAGI, Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 134-147, 2012. ISSN 0168-1656.

SAHU, D.; PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Cyanobacteria-as potential biofertilizer. **CIBTech Journal Microbiol**, v. 1, p. 20-26, 2012. ISSN 2319-3867.

SAINAZ, A.; RAGAA, A. Effect of some red marine algae as biofertilizers on growth of maize (*Zea mayz* L.) plants. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, 2013. ISSN 1985-4668.

SALOMONE, I. G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and fertility of soils**, v. 21, n. 3, p. 193-196, 1996. ISSN 0178-2762.

SANGOI, L. Evolução Genética e Morfo-Fisiológica de Cultivares de Milho, Eficiência Nutricional e Interações com o Ambiente. 2010.

SANGOI, L.; MARASCHI DA SILVA, L. M.; RENAN MOTA, M.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; DE SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho agrônomo do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum sp.* e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, 2015. ISSN 0100-0683.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Brasília, Embrapa Solos**, n. 3, p. 353, 2013.

SANTOS, J. D. S.; VIANA, T. D. O.; JESUS, C. M. D.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 1, p. 78-85, 2015. ISSN 0100-0683.

SARIG, S.; BLUM, A.; OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **The Journal of Agricultural Science**, v. 110, n. 2, p. 271-277, 1988. ISSN 1469-5146.

SEVERINO, F.; CARVALHO, S.; CHRISTOFFOLETI, P. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. II-Implicações sobre as espécies forrageiras. **Planta daninha**, v. 24, n. 1, p. 45-52, 2006. ISSN 1806-9681.

SHARIATMADARI, Z.; RIAHI, H.; SEYED HASHTROUDI, M.; GHASSEMPOUR, A.; AGHASHARIATMADARY, Z. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. **Soil science and plant nutrition**, v. 59, n. 4, p. 535-547, 2013. ISSN 0038-0768.

SHARMA, G.; MEHTA, S. Trends, Growth and Instability in Area, Production and Productivity of Maize Crop across Regions in India. **Productivity**, v. 56, n. 4, p. 368, 2016.

SHIFERAW, B.; PRASANNA, B. M.; HELLIN, J.; BÄNZIGER, M. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security**, v. 3, n. 3, p. 307, 2011. ISSN 1876-4517.

SHOLKAMY, E. N.; EL-KOMY, H.; AL-ARFAJ, A. A.; ABDEL-MEGEED, A.; MOSTAFA, A. A. Potential role of *Nostoc muscorum* and *Nostoc rivulare* as biofertilizers for the enhancement of maize growth under different doses of n-fertilizer. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 48, p. 7435-7448, 2012. ISSN 1996-0808.

SILVA, F. C. D. S. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. ISBN 8573834307.

SILVA LIBÓRIO, P. H. INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA REDUZIDA EM HÍBRIDOS DE MILHO. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 241-252, 2016. ISSN 1982-2278.

SMITH, R. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 485-492, 1992. ISSN 0008-4166.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 1461383757.

SOUZA MOREIRA, F. M.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-100, 2010. ISSN 2176-9079.

STANIER, R.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 2, p. 171, 1971. ISSN 0005-3678.

STARR, M. P.; STOLP, H.; TRÜPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G. **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 3662131870.

STEWART, W. Physiological studies on nitrogen-fixing blue-green algae. **Plant and Soil**, v. 35, n. 1, p. 377-391, 1971. ISSN 0032-079X.

STIRK, W.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.; JÄGER, K. Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 3, p. 215-221, 2002. ISSN 0921-8971.

STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. 1972.

SUEOKA, N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 46, n. 1, p. 83, 1960.

THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, p. 47-57, 2005. ISSN 0011-3891

TORRES, J. L. R.; DE FARIA, M. V.; LANA, R. M. Q.; PRUDENTE, T.; VASCONCELOS, A. C. Corn agronomic evaluation under different doses of nitrogen and seed inoculation in savanna. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 26, p. 2568-2575, 2015. ISSN 1991-637X.

TRIVELIN, P. C. O.; DE OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; DE CASTRO GAVA, G. J.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 193-201, 2002. ISSN 1678-3921.

TROYER, A. F. Adaptedness and heterosis in corn and mule hybrids. **Crop science**, v. 46, n. 2, p. 528-543, 2006. ISSN 1435-0653.

_____. Development of hybrid corn and the seed corn industry. **Handbook of maize**, p. 87-114, 2009.

VICARIO, J. C.; PRIMO, E. D.; DARDANELLI, M. S.; GIORDANO, W. Promotion of peanut growth by co-inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **Journal of plant growth regulation**, v. 35, n. 2, p. 413-419, 2016. ISSN 0721-7595.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 03, 2010. ISSN 1980-6477.

WEISMANN, M. Fases de desenvolvimento da cultura do milho. **Tecnologias e produção: Milho safrinha e culturas de inverno. Maracaju: Fundação MS**, p. 31-38, 2008.

WESTGATE, M. E. Seed formation in maize during drought. **Physiology and determination of crop yield**, n. physiologyandde, p. 361-364, 1994. ISSN 0891182462.

WHITTON, B. A. Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In: (Ed.). **Photosynthetic prokaryotes**: Springer, 1992. p.1-51.

WIETHÖLTER, D. P. S. Épocas e métodos de aplicação de nitrogênio em milho cultivado no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, 2004. ISSN 1678-4596.

WITHAM, F.; BLAYDES, D.; DEVLIN, R. Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determinations. **Experiments in Plant Physiology**, p. 55-56, 1971. ISSN 2197-0025.

YEGORENKOVA, I. V.; TREGUBOVA, K. V.; BURYGIN, G. L.; MATORA, L. Y.; IGNATOV, V. V. Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. **Canadian journal of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 279-285, 2016. ISSN 0008-4166.

ZARROUK, C. **Contribution a L'etude D'une Cianophycee: Influence de Divers Facteurs Physiques Et Chimiques Sur la Croissance Et la Photosynthese de *Spirulina Maxima* (Setch. Et Garndner) Geitler.** Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ZHANG, H.; WANG, W.; LI, Y.; YANG, W.; SHEN, G. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1710-1715, 2011. ISSN 0961-9534.

ZULPA, G.; SICILIANO, M. F.; ZACCARO, M.; STORNI, M.; PALMA, M. Effect of Cyanobacteria on the soil microflora activity and maize remains degradation in a culture chamber experiment. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 4, p. 388-392, 2008. ISSN 1560-8530.