



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JHONATAN RAFAEL WENDLING HARTMANN HISTER

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COINOCULAÇÃO DE
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE
PLANTAS NA CULTURA DO MILHO (*Zea mays*)**

Londrina

2022

JHONATAN RAFAEL WENDLING HARTMANN HISTER

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COINOCULAÇÃO DE
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE
PLANTAS NA CULTURA DO MILHO (*Zea mays*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina

2022

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

H673p Hister, Jhonatan Rafael Wendling Hartmann.
Potencial biotecnológico da coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura do milho (*Zea mays*) / Jhonatan Rafael Wendling Hartmann Hister. - Londrina, 2022.
92 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Inoculante - Tese. 2. Bioinsumos - Tese. 3. Rizosfera - Tese. I. Nogueira, Marco Antonio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

JHONATAN RAFAEL WENDLING HARTMANN HISTER

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COINOCULAÇÃO DE
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
NA CULTURA DO MILHO (*Zea mays*)**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira –
UEL / EMBRAPA

Dr. Artur Berbel Lírio Rondina – UNIFIO

Dra. Luciana Grange – UFPR

Londrina, 24 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Terezinha Wendling Hartmann, e ao meu irmão, Jair Hartmann, e ao restante da minha família pelo apoio, incentivo e amor;

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, pela confiança, incentivo e orientação constantes, pela minha formação enquanto pesquisador e pela grande amizade durante o tempo em que trabalhamos juntos;

Aos membros da banca examinadora e suplentes por disponibilizar seu tempo e contribuir com o trabalho, em especial a Dra. Luciana Grange pela amizade e por estar me ajudando a ser um profissional melhor dês da graduação, e ao Dr. Artur Berbel Lírio Rondina pela amizade e por participar ativamente da minha formação durante o mestrado.

À Dra. Mariangela Hungria, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo exemplo pessoal e profissional;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja: Gabriel Silva Guimarães, Artur Berbel Lírio Rondina, Rafaella Liviero Barbosa, Alisson Sanzovo, Aghata Charnobay, Natália Vasquez, Paloma Liborio, Luisa Ferraz, Camila Bocatti, Fernanda Moura pelos conhecimentos (científicos e não científicos) construídos e compartilhados, por nossa boa convivência diária e pelos cafés. Agradeço, sobretudo, ao Gabriel, Artur, Rafaella e Alisson, pelo auxílio na execução da parte prática deste estudo;

Aos técnicos e analistas do laboratório: Lígia, Renan, Eduara e Rinaldo, pelo suporte nas atividades realizadas;

À Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), pelo fornecimento de recursos para a compra de materiais de laboratório e para a participação em congressos científicos;

À Embrapa Soja, pela oportunidade de estágio, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento de habilidades e atividades propostas em meu projeto e pelo conhecimento técnico/científico que adquiri na empresa;

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida;

À Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação profissional e parte de minha formação pessoal,

Muito obrigado!

HISTER, J. R. W. H. Potencial biotecnológico da coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura do milho (*Zea mays*). 2022. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Microrganismos benéficos podem auxiliar no desempenho das plantas nos sistemas de produção. O objetivo desse trabalho foi avaliar a inoculação e a coinoculação de estirpes de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) na cultura do milho. Foram conduzidos dois ensaios de primavera-verão e um de verão-outono em áreas experimentais da Embrapa em Londrina e Ponta Grossa – PR. O delineamento na primeira safra foi em blocos ao acaso com seis repetições, com 12 tratamentos: três controles não inoculados e com 0%, 75% e 100% da dose recomendada de N (ureia) em cobertura (T1, T2 e T3, respectivamente); inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) (T4); *R. tropici* CIAT 899 (T5); *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6); *P. fluorescens* CNPSO 2719 (T7); *P. fluorescens* CNPSO 2719 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8); *B. subtilis* CNPSO 2657 (T9); *B. subtilis* CNPSO 2657 + *A. brasilense* Ab-V6 (T10); *Pantoea* sp. CNPSO 2798 (T11); e *Pantoea* sp. CNPSO 2798 + *A. brasilense* Ab-V6 (T12). Todos os tratamentos (co)inoculados receberam 75% da dose de nitrogênio de cobertura. O ensaio de segunda safra foi conduzido em semeadura antecipada intercalar com a cultura da soja (Sistema Antecipe®), em delineamento de blocos ao acaso com 10 tratamentos: três controles, como na primeira safra (T1, T2 e T3); *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) (T4); *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *Bacillus megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 via sementes (T5); *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 via sementes e *A. brasilense* via foliar em V4 (T6); *R. tropici* CIAT 899 via sementes (T7); *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 via sementes (T8); *B. subtilis* CNPSO 2657 via sementes (T9); e *B. subtilis* CNPSO 2657 + *A. brasilense* Ab-V6 (T10) via sementes. Todos os tratamentos (co)inoculados receberam 75% da dose de N de cobertura. Foram avaliados: Massa da parte aérea e raízes secas; teor de N na parte aérea e exportado nos grãos nos ensaios de primeira e segunda safra, e teor de P na parte aérea e P exportado nos grãos no ensaio de segunda safra; análises das atividades de β -glicosidase e fosfatase ácida na rizosfera; morfologia de raízes; e produtividade. Em Ponta Grossa, apenas a inoculação *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6) aumentou a massa de parte aérea, porém a inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4), *R.*

tropici CIAT 899 (T5) e *B. subtilis* CNPSo 2657 (T9) aumentaram a massa de raízes secas em relação ao controle não inoculado e com 100% de N. Em todos os ensaios, a inoculação ou a coinoculação aumentou o teor de N foliar em relação ao controle com 75% de N sem inoculação. Já em Londrina, na safra verão-outono, as plantas inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) e coinoculadas com *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6) tiveram maior exportação de N nos grãos. As maiores produtividades foram obtidas com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) (8318 kg ha⁻¹), *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6) (8.059 kg ha⁻¹) e *B. subtilis* CNPSo 2657 (T9) (8310 kg ha⁻¹) em relação aos controles 0% e 100% de N em cobertura. A atividade da β-glicosidase foi maior na rizosfera das plantas controles e nas inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) em ambos os ensaios de primeira safra. Quando foi realizada inoculação de uma bactéria diferente de *A. brasilense*, a atividade da enzima diminuiu na maioria dos casos. Todas as variáveis relacionadas à morfologia das raízes foram estimuladas pelas (co)inoculações. Em Londrina, a inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) e *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T5) favoreceu as características morfológicas das raízes para a absorção de nutrientes, enquanto que em Ponta Grossa foram as inoculações com *P. fluorescens* CNPSo 2718 (T7) e *Pantoea* sp. CNPSo 2798 (T11). Na segunda safra, as plantas inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) e *A. brasilense* Ab-V5 + Av-V6 + *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 (T5) apresentaram os maiores teores foliares e exportações de N e P pelos grãos. Produtividades acima de 4000 kg ha⁻¹ foram alcançadas com 100% de N (T3) em cobertura sem inoculação e na coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 (T5). A atividade da β-glucosidase na rizosfera aumentou na coinoculação com *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8) em comparação aos demais tratamentos. Novamente a maioria das variáveis relacionadas à morfologia das raízes foram favorecidas, com destaque para a inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) e *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8). A inoculação e a coinoculação do milho com RPCPs favoreceram o seu crescimento e desenvolvimento, levando ao aumento de produtividade mesmo com a redução da adubação nitrogenada de cobertura.

Palavras-chave: Inoculante. RPCP. Bioinsumos. Rizosfera. Sistema Antecipe.

HISTER, J. R. W. H. Biotechnological potential of co-inoculation of plant growth-promoting in maize (*Zea mays*). 2022. 92 f. Dissertation (Master in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Beneficial microorganisms can help the plant performance in the production systems. This work aimed to evaluate the potential of inoculation and co-inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strains in maize. Two trials were conducted for the spring-summer crop and one for the summer-autumn crop at Embrapa's experimental stations in Londrina and Ponta Grossa – PR. The experimental design in the first season was in randomized blocks with six replications, with 12 treatments: three controls without inoculation and with 0%, 75% and 100% of the recommended dose of N (urea) in top-dressing (T1, T2 and T3, respectively); inoculation with *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) (T4); *R. tropici* CIAT 899 (T5); *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6); *P. fluorescens* CNPSO 2719 (T7); *P. fluorescens* CNPSO 2719 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8); *B. subtilis* CNPSO 2657 (T9); *B. subtilis* CNPSO 2657 + *A. brasilense* Ab-V6 (T10); *Pantoea* sp. CNPSO 2798 (T11); and *Pantoea* sp. CNPSO 2798 + *A. brasilense* Ab-V6 (T12). All (co)inoculated treatments received 75% of the recommended dose of top-dressing N. The second crop trial was carried out in anticipated sowing system between soybean lines (Antecipe® System), with a randomized block design with 10 treatments: three controls, as in the first crop (T1, T2 and T3); inoculation with *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) (T4); *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *Bacillus megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 via seeds (T5); *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 via seeds and *A. brasilense* via leaves in V4 (T6); *R. tropici* CIAT 899 via seeds (T7); *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 via seeds (T8); *B. subtilis* CNPSO 2657 via seeds (T9); and *B. subtilis* CNPSO 2657 + *A. brasilense* Ab-V6 (T10) via seeds. All (co)inoculated treatments received 75% of the recommended top-dressing N dose. We assessed: shoot and root dry mass; Shoot N concentration and exported N in grains in the first and second trials, and shoot P concentration and exported P in grains in the second assay; activities of β -glucosidase and acid phosphatase in the rhizosphere soil; root morphological traits; and grain yield. In the trial carried out in Ponta Grossa, the inoculation of *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6) increased the shoot biomass, however the inoculation of *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) (T4), *R. tropici* CIAT 899 (T5) and *B. subtilis* CNPSO 2657

(T9) increased the root biomass compared with the non-inoculated control receiving 100% of N in top-dressing. In all assays, the presence of a PGPR, in inoculation or co-inoculation, increased the leaf N concentration compared with the control without inoculation and receiving with 75% of N as top-dressing. In Londrina, in the summer-autumn season, plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) and co-inoculated with *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6) had greater N exportation in grains. The highest yields were obtained in treatments with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) with 8318 kg ha⁻¹, *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T6), with 8059 kg ha⁻¹ and *B. subtilis* CNPSo 2657 (T9) with 8310 kg ha⁻¹ compared with the controls 0% and 100% of N in top-dressing. The activity of the β -glucosidase was higher in the rhizosphere of the control plants and those inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) in both first-season trials. When a bacterium other than *A. brasilense* was inoculated, the enzyme activity decreased in most cases. Inoculations stimulated all variables related to root morphological traits. In Londrina, plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) and *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T5) had root morphological traits more adapted for nutrient absorption, while in Ponta Grossa inoculations with *P. fluorescens* CNPSo 2718 (T7) and *Pantoea* sp. CNPSo 2798 (T11) improved root traits. In the second season, plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) and *A. brasilense* (Ab-V5 + Av-V6) + *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 (T5) showed the highest leaf concentrations and exports of N and P by grains. Yields above 4000 kg ha⁻¹ were achieved in treatments with 100% N (T3) in top-dressing and in the coinoculation of *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *B. megaterium* BRM 119 + *B. subtilis* BRM 2084 (T5). β -glucosidase activity in the rhizosphere increased with coinoculation with *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8) compared with the other treatments. Again, most variables related to root morphological traits were favored, in which inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (T4) and *R. tropici* CIAT 899 + *A. brasilense* Ab-V6 (T8) were the most outstanding. Inoculation and co-inoculation of maize with PGPR favored growth and development traits, increasing yield even with reduction of the top-dressing N fertilization.

Keywords: Inoculant. PGPR. Bioinputs. Rhizosphere. Antecipe System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Médias mensais de pluviosidade e temperaturas médias durante o período da condução dos experimentos de milho primeira safra em Londrina, PR (a) e Ponta Grossa, PR (b) na safra 2020/2021, e de segunda safra em Londrina, PR (c) no ano de 2021.....32
- Figura 2** – Produtividade (a), Teor de nitrogênio foliar (b) e N exportado (c) por milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = A. brasilense Ab-V5 + Ab-V6; Rhizobium = R. tropici CIAT 899; Azo + Rhi = A. brasilense Ab-V6 + R. tropici CIAT 899; Pseudomonas = P. fluorescens CNPSo 2719; Azo + Pse = A. brasilense Ab-V6 + P. fluorescens CNPSo 2719; Bacillus = B. subtilis CNPSo 2657; Azo + Bac = A. brasilense estirpe Ab-V6 + B. subtilis CNPSo 2657; Pantoea = Pantoea spp. CNPSo 2798; Azo + Pan = A. brasilense Ab-V6 + Pantoea spp. CNPSo 2798..46
- Figura 3** – Teor de N foliar em milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta Grossa. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = R. tropici CIAT 899; Azo + Rhi = A. brasilense estirpe Ab-V6 + R. tropici CIAT 899; Pseudomonas = P. fluorescens CNPSo 2719; Azo + Pse = A. brasilense Ab-V6 + P. fluorescens CNPSo 2719; Bacillus = B. subtilis CNPSo 2657; Azo + Bac = A. brasilense estirpe Ab-V6 + B. subtilis CNPSo 2657; Pantoea = Pantoea spp. CNPSo 2798; Azo + Pan = A. brasilense Ab-V6 + Pantoea spp. CNPSo 2798..48

Figura 4 – Produtividade (a), teor de N foliar (b), N exportado pelos grãos (c), teor foliar de P (d) e P exportado pelos grãos (e) de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaio de segunda safra conduzido no município de Londrina no sistema Antecipe®. Safra 2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6; Azo + Bioma = A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6 + BiomaPhos®; Bioma sem + Azo foliar = BiomaPhos® inoculado nas sementes + inoculação foliar de A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = R. tropici CIAT 899; Azo + Rhi = A. brasilense Ab-V6 + R. tropici CIAT 899; Bacillus = B. subtilis CNPSo 2657; Azo + Bac = A. brasilense Ab-V6 + B. subtilis CNPSo 2657. 49

Figura 5 – Comprimento de raízes no solo (a), Volume de raízes no solo (b) e Densidade de ramificações nas raízes (c) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = R. tropici CIAT 899; Azo + Rhi = A. brasilense Ab-V6 + R. tropici CIAT 899; Pseudomonas = P. fluorescens CNPSo 2719; Azo + Pse = A. brasilense Ab-V6 + P. fluorescens CNPSo 2719; Bacillus = B. subtilis CNPSo 2657; Azo + Bac = A. brasilense estirpe Ab-V6 + B. subtilis CNPSo 2657; Pantoea = Pantoea spp. CNPSo 2798; Azo + Pan = A. brasilense Ab-V6 + Pantoea spp. CNPSo 2798. 57

Figura 6 – Comprimento de raízes no solo (a), Volume de raízes no solo (b) e Densidade de ramificações nas raízes (c) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta grossa - PR. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = A. brasilense Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = R. tropici CIAT 899; Azo + Rhi = A. brasilense Ab-V6 + R. tropici CIAT 899; Pseudomonas = P. fluorescens

CNPSo 2719; Azo + Pse = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSo 2719; Bacillus = *B. subtilis* CNPSo 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657; Pantoea = *Pantoea* spp. CNPSo 2798; Azo + Pan = *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* spp. CNPSo 2798.59

Figura 7 – Volume de raízes no solo (a) e Densidade de ramificações nas raízes (b) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de segunda safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Azo + Bioma = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 + BiomaPhos®; Bioma sem + Azo foliar = BiomaPhos® inoculado na semente + aplicação foliar de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Bacillus = *B. subtilis* CNPSo 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657.61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Descrição dos tratamentos realizados nas áreas experimentais com milho de primeira safra em Londrina, PR e Ponta Grossa, PR, na safra 2020/2021. 35
- Tabela 2** – Caracterização química do solo das áreas experimentais com milho de primeira safra em Londrina – PR e Ponta Grossa – PR na profundidade de 0-20 e 20-40 cm, e milho segunda safra em Londrina - PR na profundidade de 0-20 cm. 35
- Tabela 3** – Descrição dos tratamentos realizados na área experimental com milho de segunda safra em Londrina, PR, conduzida em sistema Antecipe® na safra 2021. 36
- Tabela 4** – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade da enzima β -glicosidase na rizosfera de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaios de primeira safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2020/2021. 42
- Tabela 5** – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade da enzima β -glicosidase na rizosfera de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaios de primeira safra conduzidos em Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021. 43
- Tabela 6** – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade das enzimas β -glicosidase e fosfatase ácida na rizosfera de plantas de milho inoculadas e coinoculadas com RPCPs em ensaios de segunda safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2021. 44
- Tabela 7** – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento específico das raízes (CER), Densidade do tecido das raízes (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR)

de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2020/202153

Tabela 8 – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento específico de raízes (CER), Densidade do tecido as raízes no solo (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta Grossa - PR. Safra 2020/2021.54

Tabela 9 – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento de raízes no solo (CRS), Comprimento específico das raízes (CER), Densidade do tecido das raízes (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR) de plantas inoculadas e coinoculadas com RPCPs em ensaios com milho segunda safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2021.55

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO MILHO	16
2.2 USO DE MICRORGANISMOS COMO ESTRATÉGIA DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE.....	17
2.2.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	20
2.2.2 Gênero <i>Rhizobium</i>	22
2.2.3 Gênero <i>Pseudomonas</i>	23
2.2.4 Gênero <i>Bacillus</i>	24
2.2.5 Gênero <i>Pantoea</i>	25
2.3 ENZIMAS E SEU PAPEL NA QUALIDADE DO SOLO	26
2.4 SISTEMA DE CULTIVO INTERCALAR ANTECIPADO DE MILHO – ANTECIPE®	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 LOCAIS DOS EXPERIMENTOS	31
3.2 ESTIRPES DE BACTÉRIAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.3 VARIÁVEIS AVALIADAS.....	36
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As projeções indicam crescimento acelerado e contínuo da população mundial nas próximas décadas, juntamente com o aumento da expectativa de vida e do crescimento de renda, o que resultará na necessidade de aumento da eficiência produtiva de alimentos aliada à diminuição de possíveis impactos ambientais.

Atualmente, há pouca possibilidade de expansão das fronteiras agrícolas e poucos países ainda têm disponibilidade de novas áreas, as quais, em sua maior parte, estão concentradas na América Latina e África-Subsaariana. Deste modo, para que a agricultura moderna possa produzir cada vez mais, sem que áreas atualmente ocupadas com vegetação nativa sejam incorporadas ao cultivo, o que levaria a impactos ambientais, a tecnificação deve ser constante, com o desenvolvimento de novas formas de cultivo, manejos e uso de insumos.

O Brasil é um dos países em que o uso de insumos biológicos tem crescido a taxas superiores a 10% ao ano, com perspectivas de aumento nos próximos anos. Após um longo período de uso de insumos químicos na agricultura e seus efeitos colaterais no ambiente, os insumos biológicos prometem ser uma ferramenta no sistema de produção que poderá substituir parcialmente ou, em alguns casos, totalmente os insumos químicos.

A pesquisa na bioprospecção de novos microrganismos com potenciais para uso na agricultura tem se intensificado nas últimas décadas, notadamente com microrganismos diazotróficos ou promotores de crescimento de plantas por outros mecanismos de ação além da fixação de nitrogênio, trazendo ganhos de produtividade para as principais *commodities* produzidas no Brasil. Dentre estas tecnologias, a coinoculação de estirpes elite de *Bradyrhizobium* com *Azospirillum brasilense* tem se destacado com relação a aumentos de produtividade na cultura da soja, uma tecnologia que une dois mecanismos de promoção de crescimento: a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitormônios, que de forma conjunta trazem mais benefícios à cultura. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o efeito das várias combinações desses insumos biológicos sobre o desenvolvimento de outras culturas, como é o caso da cultura do milho.

Microrganismos benéficos já são estudados há muitos anos, dentre os quais as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). Seu emprego está ganhando importância nos manejos modernos, atuando por meio da

capacidade de produção de hormônios vegetais, solubilização ou fornecimento de nutrientes, aumento no desenvolvimento radicular e biocontrole de pragas e patógenos.

Frente às diversas vantagens do uso deste grupo de microrganismos benéficos nos sistemas de produção, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial promotor de crescimento por isolados de bactérias, inoculadas isoladamente ou combinadas, na cultura do milho de primeira e segunda safra.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO MILHO

Os cereais têm grande importância na economia mundial, sendo responsáveis por até 60% das calorias da dieta humana por consumo direto, produção de ração para animais ou subprodutos (DIET, 2003). O milho (*Zea mays* L.) pode ser considerado a principal cultura dentre os cereais, pois é visto como base da alimentação para grande parte da população mundial (GODFRAY et al., 2010).

O milho é uma cultura herbácea anual com metabolismo C4, da família Poaceae, originário da América Central. Seu grão possui alto teor energético, sendo utilizado para consumo *in natura*, na alimentação animal e para produção de biocombustíveis (KUMAR; JHARIYA, 2013). É cultivado no mundo todo e, nas últimas décadas, se tornou a principal cultura de grãos, com produção global de mais de 1 bilhão de toneladas, ultrapassando o arroz e o trigo (MIRANDA, 2018).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, atrás somente dos Estados Unidos e da China, com 85,75 milhões de toneladas produzidas na safra de 2020/21 em uma área de 19,87 milhões de hectares, somando as áreas de primeira e segunda safra, com uma produtividade média de 4316 kg ha⁻¹. O país é também o maior exportador do grão, com cerca de 22 milhões de toneladas exportadas em 2020/21 (CONAB, 2021). Segundo Demarchi (2011), o principal destino da produção de milho é a fabricação de ração, tanto para bovinos, quanto suínos e aves, sendo a atividade que mais influencia a economia do grão no Brasil. Estima-se que 70% da alimentação destes animais sejam baseados no consumo de milho.

No Brasil, o milho é produzido em duas épocas distintas no mesmo ano agrícola, sendo denominadas safra de verão (primeira safra) e safra de inverno ou safrinha (segunda safra). A produção de milho de segunda safra tem tido expressivo aumento em contraste à diminuição de áreas de primeira safra, por conta da concorrência com a cultura da soja (CONAB, 2021).

2.2 USO DE MICRORGANISMOS COMO ESTRATÉGIA DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE

Projeções de aumento populacional e da expectativa de vida, especialmente em países em desenvolvimento, reforçam a necessidade de se aumentar a eficiência dos sistemas de produção de alimentos sem que haja substituição de áreas com vegetação nativa por novas áreas de cultivo (FAO, 2009). Para atingir produtividades cada vez mais elevadas, a agricultura está em constante tecnificação, com surgimento de novas formas de uso e manejo de solo e da cultura e insumos empregados na produção de *commodities* que acabaram se tornando altamente dependentes de defensivos químicos e fertilizantes sintéticos (MCARTHUR; MCCORD, 2017; ROSER; RITCHIE, 2017). A adoção de práticas conservacionistas é uma estratégia utilizada para promover a produção mais eficiente de alimentos por um longo período, minimizando impactos ambientais, principalmente em relação ao monocultivo, que representa grande parte do sistema de produção mundial (SÁ et al., 2017).

Os microrganismos representam as formas mais abundantes de vida na Terra e representam a maior proporção da diversidade genética estimada no planeta (LAMBAIS et al., 2005). O solo é considerado o principal foco de diversidade biológica e, em apenas um grama, podem ser encontradas de 10^7 a 10^9 células vivas, caracterizando-se como um sistema vivo complexo e dinâmico (ALEXANDER, 1977; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). As comunidades microbianas do solo têm grande importância para o sistema, sendo responsáveis pela mineralização e síntese da matéria orgânica (NEILL et al., 2006), com papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos (BELL et al., 2005), formação e manutenção da estabilidade de agregados do solo, além de auxiliar no controle biológico e biorremediação (BOLLAG et al., 1994; GADD, 2010; WHIPPS, 2001). A capacidade dos solos sob vegetação natural ou culturas agrícolas em fornecer nutrientes às plantas é favorecida pela diversidade e atividade biológica, que contribuem para o crescimento e aumenta a resiliência das culturas (BÜNEMANN et al., 2018).

Neste contexto, o uso de microrganismos visando oferecer benefícios nutricionais, promoção de crescimento e até mesmo proteção contra patógenos tem sido uma alternativa sustentável em escala comercial na agricultura moderna (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). O aumento no rendimento das culturas devido ao uso destes microrganismos está diretamente relacionado ao melhor

entendimento das interações solo-planta e do correto manejo destes, visto que sua ação nos solos e nas plantas é de grande complexidade (DEN HERDER et al., 2010; GEWIN, 2010).

A rizosfera é a fração do solo diretamente influenciada pelas raízes das plantas, por conta da liberação de compostos orgânicos lábeis, como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, purinas, vitaminas e compostos fenólicos. Esses exsudatos são utilizados como fonte de nutrientes por diversas bactérias, sustentando assim um grupo heterogêneo de microrganismos que podem estar aderidos à superfície das raízes (rizoplano) ou livres na rizosfera (COMPANT; VAN DER HEIJDEN; SESSITSCH, 2010). A exsudação de diversas fontes de C lábil pelas raízes na rizosfera propicia o aumento da atividade, biomassa e diversidade de microrganismos de vários grupos funcionais, dentre eles as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). Este grupo de bactérias pode interagir endofiticamente nas raízes e em outros tecidos da planta ou em vida livre no solo rizosférico, utilizando de mecanismos isolados ou combinados que auxiliam no desenvolvimento das plantas (BASHAN; DE-BASHAN, 2010), tais como na produção e liberação de fitormônios (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2015), fixação biológica de nitrogênio (MARQUES et al., 2017), solubilização de fosfatos (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015; RODRIGUEZ et al., 2004) e biocontrole de patógenos (BJELIĆ et al., 2018; SHAFI et al., 2017).

As RPCPs são empregadas na agricultura desde longa data (NUNES et al., 2003). Englobam vários gêneros, tais como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea* etc., sendo o primeiro o mais estudado. Devido aos inúmeros benefícios, bactérias desses gêneros são consideradas de grande importância para muitas plantas cultivadas (SABER et al., 2012).

Estas interações benéficas entre planta-bactéria têm sido comercialmente exploradas mundialmente, com o surgimento de dezenas de produtos biológicos (inoculantes) à base de estirpes elite selecionadas para promoção de crescimento de plantas (BASHAN et al., 2016). Inoculantes são bioinsumos que possuem em sua composição microrganismos vivos capazes de trazer benefícios ao crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies de plantas (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Os inoculantes podem ser produzidos em formulações líquidas ou turfosas. A turfa é um material de origem vegetal, parcialmente

decomposto, encontrado em regiões pantanosas ou em altitudes elevadas, em que as restrições à mineralização microbiana, aliada a um longo período geológico, resulta em um material rico em carbono orgânico. A escolha da turfa como veículo em inoculantes deve-se à sua composição, que é rica em matéria orgânica, servindo como importante fonte de nutrientes para o microrganismo de interesse. A turfa também oferece proteção física aos microrganismos e permite melhor sobrevivência celular em condições edafoclimáticas adversas (HUNGRIA et al., 2000; 2005). No processo de inoculação com este material, é essencial a utilização de compostos adesivos para auxiliar na aderência do produto às sementes, como a solução de sacarose a 10% (HUNGRIA et al., 2000). Já os inoculantes líquidos consistem em culturas microbianas suspensas em meio de cultivo líquido rico em nutrientes e que podem ser acrescidos de protetores celulares. São de fácil manuseio e compatíveis com a semeadura mecanizada, oferecendo vantagem sobre os inoculantes sólidos na semeadura. Outra vantagem é a facilidade de esterilização, conferindo ausência de contaminantes e, conseqüentemente, permitindo maior concentração celular (BASHAN et al. 2014; CASSÁN et al. 2015).

Atualmente, a cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a que mais se beneficia da tecnologia da inoculação em todo o mundo, com o emprego de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. O Brasil é considerado como o líder mundial no uso destes bioinsumos para a cultura da soja (ANPII, 2016; HUNGRIA; MENDES, 2015; OKON et al., 2015) onde aproximadamente 85% da área de cultivo é inoculada anualmente (CASTRO, 2020). A inoculação em não leguminosas e a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja vêm aumentando significativamente no Brasil, apresentando um salto impressionante na comercialização de doses desses produtos nos últimos anos (HUNGRIA et al., 2010; 2015).

A aplicação simultânea de diferentes microrganismos é chamada de coinoculação, e atualmente é possível encontrar produtos desta natureza no mercado de bioinsumos. A eficiência da coinoculação depende da seleção de estirpes elite, da concentração de cada microrganismo no inoculante e do método de aplicação do produto, que pode ser diretamente na semente, no sulco de semeadura ou aplicação foliar (CAMPO et al., 2010; CASSÁN, 2015; FUKAMI et al., 2016). A necessidade de mais estudos relacionados à compatibilidade entre microrganismos e aos benefícios atribuídos a estes quando inoculados simultaneamente é de grande importância no meio agrícola atual, que cada vez mais tem buscado em aumentar a produtividade e

amenizar efeitos de estresses bióticos e abióticos de forma sustentável e economicamente viável (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Além do *A. brasilense*, diversas RPCPs vêm sendo relatadas como potenciais para coinoculação na cultura da soja, como *Pseudomonas* spp. (EGAMBERDIEVA et al. 2017; PAWAR et al. 2018), *Actinomyces* sp. (NIMNOI; PONGSILP; LUMYONG, 2014), e *Bacillus* spp. (ATIENO et al. 2012; PETKAR; DESHMUKH; JADHAV, 2018; SUBRAMANIAN et al. 2014). A coinoculação com bactérias associativas em culturas não leguminosas se mostra uma alternativa sustentável para o aumento da produtividade de culturas como o milho, trigo e arroz, utilizando estratégias combinadas de mecanismos de promoção de crescimento, dentre elas, a fixação de nitrogênio, maior tolerância a condições edafoclimáticas adversas, aumento da capacidade de competir com a comunidade microbiana nativa, aumento da quantidade de raízes, solubilização de nutrientes e produção de fitormônios (FUKAMI et al., 2016; KRUSUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; RONDINA et al., 2020; YEGORENKOVA et al., 2016).

Em estudo conduzido por Fukami et al. (2018) foi observado que a coinoculação de *Azospirillum brasilense* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6) com *Rhizobium tropici* (estirpe CIAT 899) em plantas de milho cultivadas em condição de estresse salino resultou em melhora no crescimento das plantas em comparação com as não inoculadas.

2.2.1 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* foi muito estudado na década de 70 pela sua habilidade de fixar nitrogênio atmosférico e promover crescimento de plantas, tendo ampla distribuição geográfica, tanto em regiões temperadas quanto tropicais (DOBBELAERE et al., 2002; HUNGRIA et al., 2016).

É uma bactéria Gram-negativa de vida livre, que pode se estabelecer endofiticamente nos tecidos das plantas e também no rizoplane. Tem formato de bastonete com movimento ativo comumente uniflagelado, mede 1,0 µm de diâmetro e 2,0 a 3,0 µm de comprimento (DÍAZ-ZORITA et al., 2015; HALL; KRIEG, 1984; JOFRÉ et al., 2008). Esses microrganismos têm temperatura ótima para desenvolvimento entre 28 e 41 °C. Quando supridos com fontes preferenciais de N

como amônio, nitrato, nitrito ou aminoácidos, são aeróbicos típicos, mas quando crescem dependentes da fixação de N_2 são microaerofílicos (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; DOBBELAERE et al., 2002). Dentre as espécies do gênero *Azospirillum*, a que possui maior relevância para a agricultura é o *Azospirillum brasilense*.

Estudos relacionando esta bactéria à promoção de crescimento de diversas culturas, como milho e trigo, vêm sendo conduzidos com grande frequência (CASSÁN; OKON; CREUS, 2015; HUNGRIA et al., 2010; PEREG; LUZ; BASHAN, 2016). A produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas, é o principal mecanismo atribuído ao *A. brasilense* na promoção de crescimento de plantas (MEHNAZ, 2015). A produção de auxinas, em especial o ácido indol-3-acético (AIA) promove mudanças no controle do crescimento vegetal, levando ao aumento de volume, ramificação e comprimento de raízes, em especial nos estágios iniciais da cultura (CASSÁN et al., 2014). No entanto, há relatos de produção de óxido nítrico (NO), que age como sinalizador em uma cascata de eventos mediados por hormônios que estimula o desenvolvimento de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006).

Por ser uma bactéria diazotrófica, *A. brasilense* é capaz de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o a uma forma assimilável por plantas e microrganismos (SAIKIA et al., 2012). Porém a quantidade de N fixada e disponibilizada por essa bactéria não é suficiente para suprir toda a demanda de uma planta (DÍAZ-ZORITA; FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009). Algumas estirpes de *A. brasilense* podem solubilizar fosfato, tornando-o prontamente disponível para as plantas, o que pode refletir em maiores rendimentos das culturas (TURAN et al., 2012). A atenuação de estresses abióticos como seca e salinidade (RODRÍGUEZ-SALAZAR et al., 2009), auxílio na defesa contra excesso de intensidade luminosa (BASHAN et al., 2006), proteção contra patógenos (FUKAMI et al., 2016) e fitorremediação de solos contaminados (TUGAROVA et al., 2014) são efeitos atribuídos ao *Azospirillum* sp. em plantas cultivadas.

De acordo com Fukami et al. (2016), quando inoculado em plantas de milho recebendo 67.5 kg ha^{-1} de N em cobertura (75% da dose recomendada), o *A. brasilense* promoveu aumento de 555 kg ha^{-1} na produtividade de grãos comparado com o controle na mesma dose de N e sem inoculação, e sem diferir do tratamento controle com 100% da dose de N. Diversos trabalhos atribuem aumentos de

produtividade em resposta à inoculação dessa RPCP na cultura do milho, e abre possibilidade para a diminuição da dose de fertilizante nitrogenado em até 25% (DE MORAIS et al., 2016; HUNGRIA et al., 2010; MUMBACH et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

2.2.2 Gênero *Rhizobium*

Encontrados abundantemente em solos tropicais, os rizóbios são conhecidos principalmente por estabelecer simbiose com diversas leguminosas (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012). Predominantemente utilizadas como inoculantes na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), as espécies *Rhizobium tropici* e *Rhizobium freireii* são as mais estáveis geneticamente e eficientes em realizar fixação biológica de nitrogênio, trazendo grandes benefícios à cultura (BACTERIO, 2017).

São bactérias Gram-negativas, com 0,5-0,9 µm de diâmetro e 1,2-3,0 µm de comprimento, em forma de bastonetes móveis (HUMANN; KAHN, 2015). Possuem crescimento rápido em meio de cultura e temperatura ótima entre 25 a 42 °C e pH de 4 a 9. Em condições em que realizam a fixação biológica de nitrogênio tornam-se pleomórficas, ou seja, sofrem uma série de alterações morfológicas e fisiológicas, sendo denominadas bacteriíde, que ficam abrigados nos simbiossomas nas células infectadas dos nódulos (DATTA et al., 2014).

Apesar de serem comercialmente utilizadas em inoculantes para leguminosas, estas bactérias também podem trazer benefícios para não-leguminosas, pois possuem outros mecanismos de promoção de crescimento, além da capacidade de fixar nitrogênio, como solubilização de nutrientes e produção de fitormônios (GARCÍA-FRAILE et al., 2012). O *Rhizobium* é produtor de lipo-quitto-oligossacarídeos (LQO) (fator Nod), um metabólito secundário que atua diretamente na colonização da bactéria nas raízes e na divisão celular do córtex (DARDANELLI et al. 2008). Há relatos de que este metabólito pode estar ligado à promoção de crescimento de não leguminosas, mimetizando efeitos de fitormônios como auxinas e citocinina (SMITH et al., 2015).

Estudos conduzidos por Marks et al. (2013; 2015) demonstraram que a aplicação de LQOs de *Rhizobium* combinada com a inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho tem potencial biotecnológico, sendo observado incremento

significativo do crescimento das plantas tratadas com esta combinação, comparando com tratamento sem inoculação. Outros autores também atestaram a eficiência dos rizóbios no aumento da produtividade de culturas não-leguminosas (HAHN et al., 2013; OSORIO FILHO et al., 2016; PALMERO et al., 2011). Dartora et al. (2016) demonstraram que a inoculação de uma estirpe de *Rhizobium* sp. associada a 30 kg ha⁻¹ de N na cultura do milho foi equivalente à fertilização com 160 kg ha⁻¹ do nutriente no tratamento sem inoculação.

2.2.3 Gênero *Pseudomonas*

Este gênero é comumente encontrado em solos, água e especialmente na rizosfera das plantas, possuindo diversas características que podem classificá-la como RPCP, sendo que as estirpes com maior potencial são as fluorescentes (BOSSIS et al., 2000). Várias pesquisas têm sido conduzidas globalmente para explorar o potencial destas bactérias na agricultura (SIVASAKTHI; USHARANI; SARANRAJ, 2014). São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete, com motilidade por flagelos, em grande maioria com produção de pigmento fluorescente (piocianina). Embora aeróbia obrigatória, é capaz de utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons na respiração celular em baixas concentrações de oxigênio, processo chamado de respiração anaeróbica. Seu crescimento ótimo se dá a temperaturas entre 25-30 °C (SCALES et al., 2014).

A promoção de crescimento atribuída à inoculação da espécie *Pseudomonas fluorescens* não necessariamente está ligada somente a mecanismos que auxiliam de forma direta o desenvolvimento da cultura, mas também de formas indiretas, como o biocontrole de fitopatógenos (GANESHAN; KUMAR, 2005). Este microrganismo é capaz de produzir compostos que auxiliam na proteção contra possíveis patógenos, como os sideróforos, que possuem alta afinidade com o ferro, causando a escassez do mesmo na rizosfera, assim limitando a capacidade de fungos fitopatogênicos se proliferarem naquele ambiente (DAS et al., 2007).

Além da ação de biocontrole, *P. fluorescens* pode auxiliar no crescimento de plantas pela produção de ácido indol-3-acético (AIA), um hormônio vegetal da classe das auxinas diretamente ligado à divisão e alongamento celular (DAVID; CHANDRASEHAR; SELVAM, 2018). Estas bactérias podem mobilizar

fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade da matriz mineral do solo, aumentando a disponibilidade de P para a absorção pelas plantas (LYU et al., 2016). Este mecanismo de ação ocorre pela liberação de ácidos orgânicos, que são compostos de baixo peso molecular, que quelam cátions ligados às moléculas de P, convertendo-as em formas solúveis (ARCHANA; BUCH; KUMAR, 2012). Este processo de liberação de ácidos orgânicos também promove a acidificação do solo, auxiliando na liberação de P de complexos de cálcio de baixa solubilidade (MENDES et al., 2014; LI et al., 2015).

Em estudo conduzido por Sandini et al. (2019), os efeitos atribuídos a *P. fluorescens* resultaram em ganhos em produtividade na cultura do milho entre 29 e 31% comparados com o tratamento não inoculado. A promoção de crescimento e o aumento no rendimento foram equivalentes à aplicação de 100% da dose recomendada do fertilizante nitrogenado, mesmo quando a dose do fertilizante foi reduzida em 25% nos tratamentos inoculados, sem comprometer o rendimento.

2.2.4 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende bactérias Gram-positivas que são amplamente encontradas na natureza, sendo isoladas de ambientes diversos como solo, água doce, água salgada, plantas, animais e do ar (PIGNATELLI et al., 2009). Esses microrganismos têm uma grande diversidade fenotípica, sendo capazes de tolerar ambientes com altas temperaturas e extremos de salinidade e acidez (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011), além de produtos químicos, o que é atribuído à sua capacidade de formar endósporos (BAHADIR et al., 2018).

Estirpes do gênero *Bacillus* empregadas na agricultura podem proporcionar efeitos diretos na promoção de crescimento das plantas, pela produção de fitormônios (MOHITE, 2013; WAHYUDI et al., 2011), aumentando a capacidade da planta na absorção de nutrientes e água pelo estímulo ao sistema radicial (GUPTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018) e produção de sideróforos, auxiliando no biocontrole de fitopatógenos (BJELIĆ et al., 2018; SHAFI et al., 2017).

Além dos mecanismos já citados, a capacidade de solubilização de fosfatos (BAHADIR et al., 2018; WAHYUDI et al., 2011) pode ser considerada uma importante via de auxílio no desenvolvimento das plantas. Resultados obtidos por Ribeiro et al. (2018) com estirpes de *B. subtilis* B1920, B2084, B2088 e *B. pumilus*

B1923 indicaram capacidade de mobilizar P de fontes de baixa solubilidade para formas acessíveis às plantas.

De Sousa et al. (2020) confirmaram os efeitos positivos da inoculação de estirpes de *Bacillus* sp. na cultura do milho. Houve aumento de biomassa aérea, de superfície das raízes, teor de nutrientes na parte aérea, além de incremento de produtividade de grãos em 21% e acúmulo de P nos grãos em 58%, atribuindo os resultados à produção de AIA e solubilização de fosfato.

A equipe da Embrapa Milho e Sorgo vem pesquisando e selecionando microrganismos mobilizadores de fosfato há quase 20 anos (OLIVEIRA et al., 2009, 2020; SOUSA et al., 2020; VELLOSO et al., 2020). O produto comercial Biomaphos® foi fruto destas pesquisas, com a combinação das estirpes *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *B. megaterium* (CNPMS B119). Resultados com a inoculação destas estirpes em milho apontam ganho médio de produtividade de 8,9% em experimentos realizados em vários estados do Brasil (OLIVEIRA et al., 2020).

2.2.5 Gênero *Pantoea*

O gênero *Pantoea* é composto por um amplo grupo de bactérias Gram-negativas produtoras de pigmentação amarela, em forma de bastonete, pertencente à família Enterobacteriaceae. Pode ser encontrado amplamente na natureza habitando plantas, solo, água, animais e trato intestinal de seres humanos (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015).

Grande parte das espécies pode se comportar como agentes de promoção de crescimento, trazendo benefícios aos cultivos comerciais (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015), agindo por mecanismos diretos, que incluem a fixação biológica de nitrogênio (LOIRET et al., 2004), a solubilização de fosfato inorgânico (SON et al., 2006) e a produção de hormônios vegetais (DASTAGER et al., 2009). Porém, algumas espécies de *Pantoea*, como *P. ananatis* e *P. stewartii*, são conhecidas por serem fitopatogênicas (COUTINHO; VENTER, 2009; ROPER, 2011).

Estas bactérias também são capazes de atuar indiretamente sobre o crescimento das plantas, como pela redução dos níveis de etileno pela ação da enzima 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) deaminase (LONG et al., 2008),

supressão de patógenos e biorremediação do solo pela capacidade de degradação de herbicidas sem produção de subprodutos tóxicos (PILEGGI et al., 2012).

Essa versatilidade e adaptabilidade ambiental aliada a uma variedade de recursos biossintéticos relacionados ao biocontrole e à promoção de crescimento de plantas, além da biorremediação do solo, podem ser aproveitados para aplicações com potencial utilidade em ambientes agrícolas (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015).

2.3 ENZIMAS E SEU PAPEL NA QUALIDADE DO SOLO

A qualidade do solo pode ser definida como a sua capacidade de funcionar dentro dos limites do ecossistema e do uso da terra para sustentar a produtividade biológica, promover saúde vegetal e animal, e manter a qualidade ambiental (DORAN; PARKIN, 1994). Já a saúde do solo compreende a dinâmica e a natureza viva do solo, com foco na sua capacidade contínua de manter suas funções e sustentar o crescimento das plantas (PANKHURST et al., 1997). Desta forma, Mendes et al. (2019) descrevem um solo saudável como um solo biologicamente ativo, que seja produtivo, capaz de armazenar água e nutrientes e sequestrar carbono (C), entre outros serviços ambientais.

Do ponto de vista de avaliação da qualidade, a atividade de enzimas do solo pode fornecer diversas informações úteis, pois boa parte dessa atividade está relacionada à interação com a matéria orgânica e com a fração argila, sendo então utilizadas como indicadores de um manejo adequado quanto à estabilização da matéria orgânica e de outras propriedades físicas estruturais associadas. Desta forma, as atividades das enzimas tendem a se correlacionar com o teor de matéria orgânica do solo, constituindo-se em impressões digitais dos sistemas de manejo em que o solo foi submetido (GREEN et al., 2007; KANDELER et al., 1999).

Enzimas extracelulares presentes no solo, tais como hidrolases (α e β -glicosidases, fosfatases, proteases) e oxidorreduções (fenoloxidasas e peroxidases), são muito importantes por desempenhar funções ligadas aos ciclos biogeoquímicos do C, P e N, por exemplo, podendo fornecer indiretamente informações sobre a atividade biológica do solo que atuam na degradação de moléculas orgânicas complexas e/ou de moléculas orgânicas simples,

disponibilizando estes produtos para os demais microrganismos e plantas do meio (MARTINEZ et al., 2007; SILVEIRA, 2007).

A fim de estimar a atividade enzimática, que pode estar diretamente relacionada com a capacidade produtiva do solo, a Embrapa lançou a Tecnologia de Bioanálise de solo (BioAS), que consiste na agregação de parâmetros relacionados ao funcionamento microbiológico do solo às análises químicas de rotina da avaliação da fertilidade (MENDES et al., 2019). Estes estudos resultaram na indicação de duas enzimas extracelulares, a Arilsulfatase e a β -glicosidase, cujos níveis de atividade foram correlacionados com a capacidade produtiva do solo, obtendo-se tabelas de interpretação para o cerrado brasileiro.

As enzimas α -glicosidases e β -glicosidases desempenham papel importante na quebra de oligossacarídeos de baixa massa molecular e liberação de monossacarídeos, além de catalisar a hidrólise de diferentes glicosídeos, agindo diretamente no ciclo do C no solo (BAKSHI; VARMA, 2011). Já as aril-sulfatases são enzimas que participam do ciclo do enxofre (S) e atuam na hidrólise de ligações orgânicas do tipo ésteres sulfato liberando íons sulfato de compostos orgânicos (TABATABAI; BREMNER, 1970). Por meio dos processos de mineralização, acredita-se que esta enzima seja responsável pela ciclagem do S orgânico no solo, liberando sulfato, que é a forma passível de absorção e assimilação pelas plantas (AL-KHAFAJI; TABATABAI, 1979; MENDES et al., 2019).

Outro grupo de enzimas do solo que tem sido considerado bom bioindicador da sua qualidade é o grupo das fosfatases. Este grupo é composto pelas fosfomonoesterases ácidas e alcalinas que catalisam a hidrólise de ésteres fosfatos e liberam fosfatos presentes em ácidos nucleicos, ácido fítico, açúcares fosfatos e fosfatos de inositol (KEDI et al., 2012; NANNIPIERI et al., 2011). Mais de 70% dos microrganismos do solo são capazes de produzir fosfatases, incluindo gêneros de microrganismos de interesse agrícola como *Bacillus*, *Proteus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Pseudomonas* (NANNIPIERI et al., 2011; PLANTE, 2007).

Em ensaio conduzido por Mendes et al. (2019) na cultura da soja, oito sistemas de cultivo/produção, incluindo monocultivo, sucessão e rotação de culturas, foram avaliados quanto aos bioindicadores de qualidade de solos propostos (β -glicosidase, arilsulfatase e fosfatase ácida) e comparados com a análise química padrão e a produtividade de soja. A ocorrência de veranico no período do ensaio

evidenciou a diferença de produtividade que chegou a 1800 kg ha⁻¹ no sistema de rotação de culturas, em comparação com o monocultivo. Entretanto, apesar da diferença significativa na produtividade de grãos, as características químicas dos solos na camada de 0-10 cm foram semelhantes. Em sistema de sucessão Soja/Milho foram observadas atividades de 108 mg de p-nitrofenol/kg /h para β -glicosidase e 494 mg de p-nitrofenol/kg/h para fosfatase ácida, enquanto no sistema Soja/Milho+Braquia (consórcio) foram verificados maiores níveis de atividade de β -glicosidase e fosfatase ácida (151 e 608 mg de p-nitrofenol/kg /h respectivamente). Deste modo, áreas com teores semelhantes de nutrientes, mas com produtividades de grãos distintas, evidenciaram a importância do componente biológico do solo para explicar tais diferenças.

2.4 SISTEMA DE CULTIVO INTERCALAR ANTECIPADO DE MILHO – ANTECIPE®

O aumento da área cultivada com milho de segunda safra está intimamente relacionado ao avanço do cultivo da soja sobre as áreas de primeira safra (CONAB, 2021). Porém, o sucesso da produção deste cultivo depende principalmente da época de semeadura, sobretudo pela redução da disponibilidade de água no solo e diminuição da temperatura do ar quando o ciclo da cultura se estende para o inverno. Desta forma, quanto mais tarde for realizada a semeadura, maior o risco de perdas por geada e/ou seca (KARAM et al., 2020).

O melhoramento genético da soja ao longo dos anos buscando precocidade, aliada ao tipo de crescimento indeterminado, tem possibilitado a antecipação na época de semeadura e, conseqüentemente, da colheita da cultura, o que também favorece o avanço de áreas semeadas com milho na segunda safra após a soja, devido a menores riscos para o cultivo (CONTINI et al., 2019). O milho, entretanto, no decorrer dos anos, pouco evoluiu em termos de ciclo de desenvolvimento para se adequar à sucessão após a soja, embora haja consenso que devem ser utilizados genótipos de ciclo precoce, aumentando as chances de suprimento adequado de água pelas chuvas na época de maior exigência da planta (DUARTE; CECCON, 2019).

Desta forma, a proposta do sistema de cultivo intercalar antecipado (Antecipe®) indicado pela Embrapa Milho e Sorgo desponta como uma nova

estratégia, em que é possível semear mecanicamente a cultura do milho nas entrelinhas da cultura da soja antes da colheita, antecipando em até 20 dias a semeadura da cultura do milho (KARAM et al., 2020).

Cultivos intercalares já são amplamente utilizados na agricultura brasileira. Por definição, cultivo intercalar (ou consorciado) é um sistema que envolve a semeadura de duas ou mais espécies na mesma área, de modo que ambas possam conviver durante todo seu ciclo, ou parte dele (PORTES, 2003), sendo possível esse consórcio devido ao diferencial de crescimento, desenvolvimento e acúmulo de biomassa pelas espécies consorciadas (CRUSCIOL et al., 2010).

O sistema Antecipe® não visa a substituição do sistema de cultivo tradicional do milho de segunda safra, mas apenas tem por objetivo reduzir o risco de perdas em áreas em que a semeadura tem sido realizada ao final da janela preconizada para cada região, definida pelo Zoneamento Agrícola de Risco Climático (Zarc) publicado pelo MAPA (KARAM et al., 2020). Nesse sistema, o milho é semeado nas entrelinhas da cultura da soja entre os estádios R5 e R7, de forma que as plantas de milho já estarão emergidas e com cerca de 3 a 4 folhas no momento da colheita da cultura da soja. A operação de colheita da soja corta as folhas das plantas de milho, porém neste estágio vegetativo, seu meristema apical caulinar ainda se encontra abaixo da superfície do solo, possibilitando o rebrote e a continuar o ciclo sem causar perdas de produtividade. Posterior ao corte das plantas durante a colheita da soja deve-se realizar a adubação nitrogenada de cobertura, considerando as recomendações já consolidadas pela pesquisa (KARAM et al., 2020).

Estudos indicam que a desfolha precoce do milho causada pela colheita da soja no sistema Antecipe® não afeta a produtividade da gramínea. Silva e Dalchiavon (2020) e Karam et al. (2010), em trabalhos avaliando o desempenho do milho submetido à desfolha, observaram que os componentes de produção: altura de inserção da espiga, altura de plantas, acúmulo de massa seca e produtividade de grãos não foram afetados quando a desfolha ocorreu até o estágio V4. Porém, quando as plantas foram submetidas a desfolhas tardias entre V12 e R1, houve perdas significativas de produtividade.

O sistema Antecipe® possibilita aumentos de produtividade pelo fato de a semeadura poder ser realizada em um momento mais propício para o desenvolvimento da planta, ainda com disponibilidade de água no solo e temperaturas mais favoráveis. Em um dos estudos realizados por Karam et al. (2020), comparando

o cultivo intercalar antecipado com a semeadura tradicional após a colheita da soja, mostraram que a antecipação aumentou a produtividade em 12% nas condições do experimento em Londrina, PR, quando a semeadura foi realizada com 14 dias antes da colheita da soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

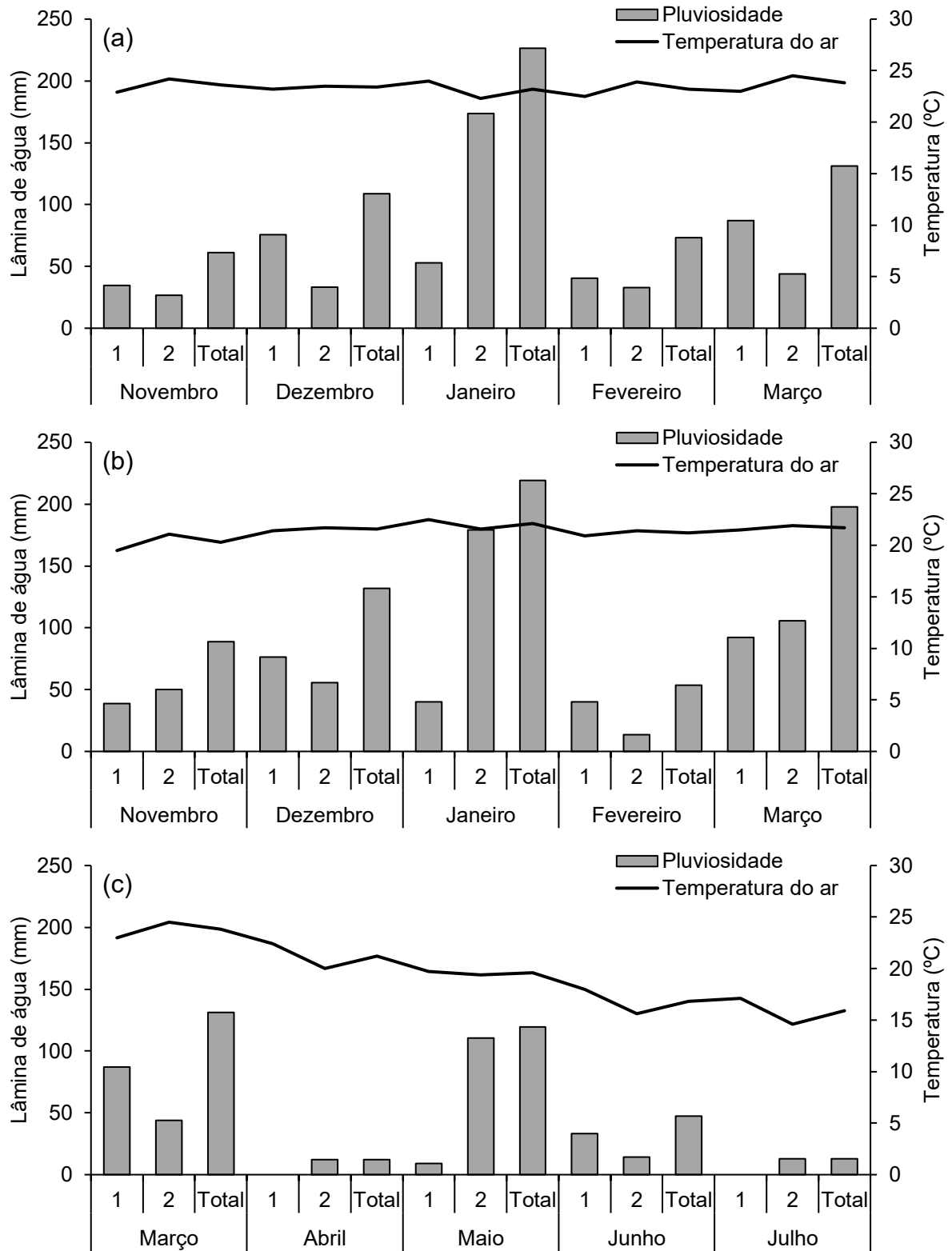
3.1 LOCAIS DOS EXPERIMENTOS

Foram conduzidos três ensaios a campo, dois na primeira safra e um na segunda safra de milho. Em Londrina, PR (23° 11' 02.39" S; 51° 10' 32.84" W e altitude de 595 m) foram instalados um ensaio na primeira safra 2020/2021 e um na segunda safra de 2021, este no sistema Antecipe®. Em Ponta Grossa, PR (25° 09' 04.66 "S; 50° 04' 27.45" W e altitude de 880 m) foi conduzido um ensaio na primeira safra 2020/2021.

A área de Londrina tem solo argiloso classificado como LATOSSOLO Vermelho eutroférico. O clima é do tipo Cfa (subtropical úmido) segundo classificação de Köppen, com temperaturas médias no mês mais quente de 22 °C ou superior. A semeadura do ensaio de milho primeira safra em Londrina foi realizada no dia 04 de novembro de 2020, sendo necessária a realização de irrigação (equivalente a uma lâmina de 10 mm) para auxiliar na germinação e emergência da cultura. O regime hídrico durante o ciclo foi de 600 mm distribuídos em 22 semanas (Figura 1a). Já a semeadura do ensaio de segunda safra, sob o sistema Antecipe®, foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2021, com um regime hídrico de 340 mm nas 22 semanas de ciclo, sendo acometido por déficit hídrico na fase de enchimento de grãos (Figura 1c) e por duas geadas fracas no final do seu ciclo reprodutivo.

A área de Ponta Grossa tem solo de textura média, classificado como LATOSSOLO vermelho distrófico. O clima é do tipo Cfb (temperado com verão ameno), segundo classificação de Köppen, com chuvas uniformemente distribuídas sem estação seca definida e a temperatura média do mês mais quente não chega a 22 °C. A semeadura na área de Ponta Grossa foi realizada no dia 26 de novembro de 2020. O regime de chuvas nas 18 semanas de ciclo foi de 628 mm (Figura 1b).

Figura 1 – Médias mensais de pluviosidade e temperaturas médias durante o período da condução dos experimentos de milho primeira safra em Londrina, PR (a) e Ponta Grossa, PR (b) na safra 2020/2021, e de segunda safra em Londrina, PR (c) no ano de 2021.



3.2 ESTIRPES DE BACTÉRIAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As bactérias selecionadas para a realização dos experimentos consistem em seis isolados depositados na “Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas da Embrapa Soja” (*World Federation Culture Colletion WFCC #1213; World DataCenter of Microorganisms, WDCM #1054*): *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 (CNPSO 2083) e Ab-V6 (CNPSO 2084), *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 (CNPSO 103), que já são utilizados comercialmente em inoculantes comerciais, três isolados potenciais de *Pseudomonas fluorescens* (CNPSO 2719), *Bacillus subtilis* (CNPSO 2657) e *Pantoea* sp. (CNPSO 2798) e o inoculante comercial BiomaPhos® (composto por cepas de *Bacillus subtilis* BRM 2084 e *Bacillus megaterium* BRM 119), este empregado apenas no experimento de verão-outono.

Para a produção dos inoculantes, as estirpes da coleção foram estriadas em placas de Petri, utilizando para *A. brasilense* meio de cultura Dygs solidificado (1,5 g L⁻¹ de peptona; 2 g L⁻¹ de ácido málico; 2 g L⁻¹ de glicose; 1,5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 0,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 1,5 g L⁻¹ de ácido glutâmico e 15 g L⁻¹ ágar; pH ajustado para 6,5) (FUKAMI et al., 2016); para *R. tropici* foi empregado o meio de cultura YMA (Yeast Manitol Agar) (5 g L⁻¹ de Manitol; 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,1 g L⁻¹ de NaCl; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0,4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ ágar e pH ajustado para 6.8) (VINCENT, 1970); e para as demais bactérias foi utilizado o meio de cultura TS (*Trypticase Soy*®) (30 g L⁻¹ de caldo trípico de soja Acumedia, 15 g L⁻¹ ágar e com pH ajustado para 7.3); os cultivos foram incubados em BOD, no escuro, a 28 °C. Após tempo de crescimento adequado para cada microrganismo, colônias isoladas foram alçadas e transferidas para tubos de ensaios contendo 100 mL dos respectivos meios de cultura líquidos, e mantidos sob agitação a 200 rpm, a 28 °C até a obtenção da concentração desejada de 1,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹ que foi estimada conferindo a densidade óptica a 600 nm. O inoculante comercial contendo as cepas de *Bacillus subtilis* BRM 2084 e *Bacillus megaterium* BRM 119 foi usado conforme a recomendação do fabricante, em sua formulação comercial.

A inoculação foi realizada em 500 g de sementes em sacos plásticos, para cada tratamento, aplicando-se a dose proporcional recomendada pelos fabricantes dos inoculantes (100 mL para cada 20 kg de sementes) no caso das

estirpes empregadas em inoculantes comerciais. Para as estirpes não comerciais, o volume empregado foi o mesmo, com a mesma concentração celular ajustada em todos os inóculos ($1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Com o auxílio de uma micropipeta, as respectivas doses foram aplicadas sobre as sementes. Em tratamentos em que houve coinoculação de *A. brasilense* com outras bactérias o *A. brasilense* foi inoculado primeiramente. A semeadura foi realizada após a homogeneização e secagem à sombra do inóculo sobre as sementes. Os procedimentos de multiplicação e de inoculação das bactérias foram os mesmos em todos os experimentos.

O híbrido empregado nos três ensaios foi o Pioneer 30F53 VYHR, precoce, com finalidade para grão/silagem com elevado potencial produtivo. De acordo com o obtentor, o híbrido é suscetível ao complexo de enfezamento (Corn stunt) (PIONEER SEMENTES, 2021).

O delineamento experimental para os ensaios de primeira safra (primavera-verão) foi em blocos ao acaso com seis repetições, com 12 tratamentos (Tabela 1). Foi realizada adubação de base no momento da semeadura de acordo com a interpretação da análise de solo (Tabela 2) proposta por Pauletti e Motta (2017), nos dois experimentos de milho primeira safra, sendo aplicados 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ de K₂O e 24 kg ha⁻¹ de N. A aplicação de N em cobertura foi realizada aos 30 dias após a emergência (DAE), sendo 100% da dose de N em cobertura correspondente a 120 kg ha⁻¹ de N. Todos os tratamentos com inoculação simples ou coinoculação receberam o equivalente a 75% da dose de nitrogênio (90 kg ha⁻¹ de N) em cobertura na forma de ureia.

Em todos os ensaios, a densidade populacional final foi de 60 mil plantas ha⁻¹. Nos ensaios de milho primeira safra as parcelas foram compostas por oito linhas de 6 m de comprimento, com espaçamento entrelinhas de 0,50 m, totalizando 24 m². As avaliações foram realizadas nas quatro linhas centrais e desconsiderando 1,0 m em cada extremidade da parcela.

No ensaio de segunda safra não foi realizada adubação de base na cultura do milho, apenas N-ureia (75 ou 100% da dose) foi aplicado em cobertura 30 DAE, sendo 100% da dose recomendada correspondente a 100 kg ha⁻¹ de N, além do controle absoluto sem N. O delineamento experimental para os ensaios de segunda safra foi em blocos ao acaso com quatro repetições e 10 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos realizados nas áreas experimentais com milho de primeira safra em Londrina, PR e Ponta Grossa, PR, na safra 2020/2021.

Tratamentos	Combinações*
T1	Sem inoculação e sem N em cobertura
T2	Sem inoculação com 75% da dose de N em cobertura
T3	Sem inoculação com 100% da dose de N em cobertura
T4	<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)
T5	<i>R. tropici</i> (CIAT 899)
T6	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>R. tropici</i> (CIAT 899)
T7	<i>P. fluorescens</i> (CNPSO 2719)
T8	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>P. fluorescens</i> (CNPSO 2719)
T9	<i>B. subtilis</i> (CNPSO 2657)
T10	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>B. subtilis</i> (CNPSO 2657)
T11	<i>Pantoea</i> sp. (CNPSO 2798)
T12	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>Pantoea</i> sp. (CNPSO 2798)

Tabela 2 – Caracterização química do solo das áreas experimentais com milho de primeira safra em Londrina – PR e Ponta Grossa – PR na profundidade de 0-20 e 20-40 cm, e milho segunda safra em Londrina - PR na profundidade de 0-20 cm.

Prof. cm	pH H ₂ O	Al ³⁺	H + Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	CTC	V% %	P mg dm ⁻³
Cmolc dm ⁻³									
Primeira safra - Londrina - PR									
0-20	6,0	0,0	3,28	5,03	3,43	1,00	12,74	74	25,70
20-40	5,5	0,0	3,72	3,42	2,26	0,57	9,98	63	7,50
Primeira safra - Ponta Grossa - PR									
0-20	5,0	0,03	5,44	3,65	1,55	0,67	11,30	52	21,10
20-40	4,9	0,06	5,56	2,66	1,37	0,43	10,03	45	2,10
Segunda safra – Londrina – PR									
0-20	5,1	0,09	3,51	2,51	0,99	0,24	7,25	52	22,5

P (Mehlich-1); H + Al (SMP); Al, Ca, Mg e K (1.0 mol L⁻¹ KCl). SB soma de bases (Ca+Mg+K); CTC capacidade de troca de cátions; V % saturação por bases.

As parcelas foram compostas por quatro linhas de 8 m de comprimento, com espaçamento entrelinhas de 0,50 m, totalizando 16 m². As avaliações foram realizadas nas duas linhas centrais e desconsiderando 1,0 m em cada extremidade da parcela.

Tabela 3 – Descrição dos tratamentos realizados na área experimental com milho de segunda safra em Londrina, PR, conduzida em sistema Antecipe® na safra 2021.

Tratamentos	Combinações*
T1	Sem inoculação e sem N em cobertura
T2	Sem inoculação com 75% da dose de N em cobertura
T3	Sem inoculação com 100% da dose de N em cobertura
T4	<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)
T5	<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) e BiomaPhos®
T6	BiomaPhos® sementes + <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) foliar*
T7	<i>R. tropici</i> (CIAT 899)
T8	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>R. tropici</i> (CIAT 899)
T9	<i>B. subtilis</i> (CNPSO 2657)
T10	<i>A. brasilense</i> (Ab-V6) + <i>B. subtilis</i> (CNPSO 2657)

*Aplicação foliar realizada em estágio vegetativo V4.

3.3 VARIÁVEIS AVALIADAS

Aos 45 DAE coletaram-se cinco plantas por parcela para avaliação da massa da parte aérea seca (MPAS) e massa de raízes secas (MRS). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 55-60 °C por 72 h e pesadas. Na mesma ocasião, foram obtidas amostras de solo rizosférico (solo aderido às raízes) para análises das atividades das enzimas β -glicosidase (TABATABAI, 1994) e fosfatase ácida (TABATABAI; BREMNER, 1969), importantes componentes da atividade bioquímica da rizosfera. As metodologias basearam-se na determinação colorimétrica do p-nitrofenol produzido pelas enzimas do solo, proveniente da hidrólise do substrato incubado em uma solução tamponada. Para a determinação da atividade da β -glicosidase, três alíquotas de 1,00 g de cada amostra foram incubadas a 37 °C por 1 h em Erlenmeyer de 50 mL, sendo duplicatas que receberam o substrato e uma prova em branco. As amostras receberam 4 mL de tampão MUB pH 6,0 e 1 mL de solução p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNG) como substrato (exceto nos brancos). Após a paralização da reação com 1 mL de solução CaCl_2 0,5 M, foram adicionados 4 mL de THAM pH 12,0 e, nas provas em branco, o substrato. Após homogeneização em vórtex, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo e realizada leitura da

coloração amarela em espectrofotômetro a 420 nm e calculada a atividade enzimática com base em uma reta-padrão obtida com p-nitrofenol (TABATABAI, 1994).

A determinação da atividade da enzima fosfatase ácida no solo rizosférico foi realizada apenas no experimento de segunda safra, por meio de procedimentos semelhantes aos da β -glicosidase, apenas substituindo alguns reagentes. Para fosfatase ácida foi utilizado tampão MUB pH 6,0, substrato p-nitrofenil fosfato de sódio (PNF), e NaOH 0,5 M ao invés do THAM pH 12,0 (TABATABAI; BREMNER, 1969), quantificando-se p-nitrofenol produzido por leitura em espectrofotômetro a 410 nm com base em reta-padrão.

No estágio de florescimento pleno (R2) foram amostradas 20 folhas diagnóstico por parcela (terço médio da folha superior oposta à espiga, desprezando-se a nervura central) para determinação dos teores de N e P. As amostras foram secas em estufa, moídas em moinho de plantas (< 1,0 mm) e em tubo de digestão 0,1000 g foi digerido em 1,5 mL de ácido sulfúrico PA na presença de catalisadores (0,05 g de $K_2SO_4 + CuSO_4$; 10:1, m/m) e 3 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi aquecida gradualmente até 350 °C e, depois de completa a digestão, o material foi diluído (1/600) em água destilada. Para a determinação do teor de N o extrato, foram adicionados, em 1 mL da diluição, 6 mL de água destilada, 1 mL do reagente A ($C_7H_6O_3$ 50 g L^{-1} + $C_6H_5Na_3O_7$ 50 g L^{-1} + NaOH 25 g L^{-1}), 1 mL do reagente B ($Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ 1,0 g L^{-1}) e 1 mL do reagente C (NaClO 0,15%) e, após 1 h de reação, foi feita a leitura a 697 nm em espectrofotômetro (WILLIS et al. 1996).

A determinação do teor de P foi realizada no estudo de segunda safra de acordo com o método de Murphy e Riley (1962). Foi pesado 0,500 g das amostras moídas de folhas e de grãos em tubos de digestão com adição de 6 mL de uma mistura de HNO_3 e $HClO_4$ na proporção de 4:1 (v:v). A mistura foi aquecida gradualmente até 210 °C e, depois de completa a digestão, o material foi transferido para balão volumétrico de 50 mL e completo o volume com água destilada. Para a determinação do P, o extrato foi diluído com água para que a leitura ficasse no intervalo de leitura da curva de calibração, 1:10 para as amostras de folha. Posteriormente, foram adicionados, 20 mL da diluição e 4 mL da solução (H_2SO_4 140 mL L^{-1} ; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 40 g L^{-1} ; $C_4H_4O_7KSb$ 2,743 g L^{-1} ; e $C_6H_8O_6$ (0,1 M) 17,6 g L^{-1}), realizada a homogeneização da mistura e, após 2 h de reação, foi feita a leitura a 882 nm em espectrofotômetro.

Para a amostragem de raízes para as análises morfológicas foram coletadas três amostras indeformadas com cilindros metálicos de 192,3 cm³ (5 cm de altura e 7 cm de diâmetro) a uma distância de 5 cm da planta, no estágio de florescimento pleno (R2). As amostras indeformadas de solo contendo raízes foram imersas em água durante 15 min e submetidas a peneiramento úmido (malha de 0,50 mm) para obtenção de raízes vivas. Estas foram separadas manualmente das raízes mortas com base na coloração, elasticidade, e grau de consistência dos tecidos (GOWER, 1987) e, em seguida, armazenadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool etílico (FAA).

Em cada amostra foram determinadas as seguintes variáveis: Comprimento de raiz no solo (CRS), pelo método de interseção com linhas em placa de Petri (TENNANT, 1975), em que amostras das raízes foram pesadas, dispostas aleatoriamente em uma placa de Petri contendo linhas paralelas com 1 cm de distância e feita a contagem dos interceptos com as linhas, empregando-se a fórmula:

$$CRS = \frac{\left(\frac{(N \times 0,7857) \times MFR}{MFFR} \right)}{576,9}$$

onde N é o número de interceptos, 0,7857 o valor do fator de conversão para comprimento, MFR a massa fresca das raízes coletadas nos cilindros, MFFR a massa fresca das frações da raiz distribuídas aleatoriamente na placa de Petri e 576,9 é o volume dos três cilindros de coleta. A densidade de ramificações da raiz (DRR) (RONDINA et al., 2020), estimada pela quantidade de raízes laterais, realizada em uma fração da respectiva amostra e contando até obter 120-150 ramificações, com posterior pesagem da fração analisada. Para calcular o DRR a fórmula utilizada é:

$$DRR = \frac{\left(\frac{MFR \times NRA}{MFFR} \right)}{CTAR}$$

Onde, MFR é a massa fresca da amostra de raízes obtida dos cilindros, NRA o número de ramificações na amostra, MFFR a massa fresca dos fragmentos utilizados e CTAR é o comprimento total da amostra de raízes coletada. O volume de raízes no solo (VRS) foi obtido mergulhando-se uma massa conhecida de raízes finas em proveta graduada contendo água e obtendo-se o volume de líquido deslocado; a massa das raízes secas (MRS) foi obtida após secagem em sacos de papel em estufa a 60 °C até peso constante; a densidade dos tecidos das raízes (DTR) foi calculada pela razão

entre a massa seca e o volume da raiz; o comprimento específico da raiz (CER) foi obtido pela razão entre a densidade de comprimento pela sua massa seca. O diâmetro médio das raízes (DMR) (RONDINA et al., 2020) foi estimado pela fórmula:

$$DMR = \left(\frac{VR}{CTAR \times \pi \times 100} \right)^{0,5} \times 20000$$

Onde VR representa o volume e CTAR é o comprimento total da amostra de raízes.

A produtividade de grãos nos ensaios (exceto para o ensaio de milho primeira safra em Ponta Grossa que foi acometido pelo complexo de enfezamento na fase reprodutiva da cultura, impossibilitando a colheita) foi estimada com a coleta e debulha das espigas da área útil da parcela, estimando-se a produtividade por hectare com umidade ajustada a 13%.

Os grãos obtidos foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C por 72 h e moídos para determinação dos teores de N e P nos grãos, utilizando-se as mesmas metodologias de determinação de N e P nas folhas após digestão ácida, com quantificação colorimétrica como já descrito. Após a obtenção dos teores nos grãos foi calculada a quantidade de N e P exportados, em kg ha⁻¹, multiplicando-se o teor pela produtividade.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de homocedasticidade de Bartlett. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e, quando o efeito de tratamentos for significativo, foi realizada a comparação de médias pelo teste de Duncan a $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico STATISTICA v.12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4 RESULTADOS

Houve efeito significativo dos tratamentos nas variáveis MPAS e MRS nos ensaios de primeira safra em Londrina e Ponta Grossa, mas não no ensaio conduzido no sistema Antecipe® na segunda safra. No ensaio conduzido em Londrina (Tabela 4), a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657 resultou em maior MPAS, diferindo significativamente dos tratamentos controle 100% de N, coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, inoculação de *P. fluorescens* CNPSO 2719 e a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719. No experimento conduzido em Ponta Grossa (Tabela 5), destacaram-se as plantas coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, diferindo significativamente dos três controles (0, 75 e 100% de N), da mesma forma que as plantas coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657, diferiram dos controles 75% N e 100% N.

Para a MRS em Londrina (Tabela 4), as plantas dos tratamentos controle com 75% N, *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e *B. subtilis* CNPSO 2657 se destacaram das demais, diferindo estatisticamente daquelas do controle 0% N, controle 100% N, *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, *P. fluorescens* CNPSO 2719, e *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719. Para o ensaio em Ponta Grossa (Tabela 5) a inoculação padrão de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e a inoculação apenas com *R. tropici* CIAT 899 resultaram nos maiores valores, diferindo dos demais tratamentos. Por outro lado, os menores valores foram observados nas plantas controle 0% de N e na inoculação apenas com *Pantoea* sp. CNPSO 2798.

A atividade da enzima β -glicosidase no ensaio de milho primeira safra em Londrina (Tabela 4) foi maior nos três controles não inoculados e na inoculação padrão com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, com maiores médias obtidas no controle 100% N com 316,5 μg p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ e no tratamento com inoculação padrão de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) com 305,1 μg p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. No ensaio de milho de primeira safra em Ponta Grossa (Tabela 5) os controles com 75% e 100% de N, inoculação padrão de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSO 2798 se destacaram das demais, com maiores valores. Os controles 75% e 100% de N obtiveram as maiores médias, diferindo estatisticamente de todas as

coinoculações e inoculações, exceto da inoculação padrão com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSo 2798. Em todos os tratamentos em que houve a presença de uma bactéria diferente de *A. brasilense* houve redução da atividade da enzima em ambos os ensaios, exceto na coinoculação com *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSo 2798 no ensaio de Ponta Grossa. Já no ensaio de segunda safra em Londrina (Tabela 6), o tratamento coinoculado de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 resultou nos maiores valores, com 315,1 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos demais. As demais inoculações e coinoculações não diferiram de nenhum dos controles, exceto o tratamento inoculado com *B. subtilis* CNPSo 2657, que obteve a menor média, 223,8 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A atividade da enzima fosfatase ácida na rizosfera das plantas do ensaio de milho segunda safra em Londrina (Tabela 6) foi maior no controle 100% de N, com 828,5 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, diferindo dos demais tratamentos, exceto inoculação padrão de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, com 757,9 e 765,1 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4 – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade da enzima β -glicosidase na rizosfera de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaios de primeira safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2020/2021.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	β -glicosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Controle 0% de N	72,0 a-c	13,6 b-d	299 a
Controle 75% de N	73,6 a-c	16,4 a	275 a
Controle 100% de N	66,4 c	11,9 d	317 a
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	78,6 ab	16,6 a	305 a
<i>R. tropici</i>	73,8 a-c	14,7 ab	215 b
Ab-V6 + <i>R. tropici</i>	69,2 bc	13,5 b-d	204 bc
<i>P. fluorescens</i>	65,8 c	12,2 cd	178 bc
Ab-V6 + <i>P. fluorescens</i>	65,6 c	13,1 b-d	210 b
<i>B. subtilis</i>	77,0 a-c	16,5 a	191 bc
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	82,6 a	14,6 a-c	160 c
<i>Pantoea</i> sp.	73,2 a-c	14,8 ab	172 bc
Ab-V6 + <i>Pantoea</i> sp.	79,0 ab	14,4 a-c	189 bc
Valor de <i>P</i>	0,018	<0,0001	<0,0001
CV %	13,84	16,56	29,53

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

Tabela 5 – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade da enzima β -glicosidase na rizosfera de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaios de primeira safra conduzidos em Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	β -glicosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Controle 0% de N	192 b-d	49,3 c	90,3 c
Controle 75% de N	174 d	52,7 bc	120 a
Controle 100% de N	181 cd	55,6 bc	116 a
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	200 a-c	79,9 a	110 ab
<i>R. tropici</i>	186 b-d	80,5 a	98,0 bc
Ab-V6 + <i>R. tropici</i>	216 a	64,0 b	96,4 bc
<i>P. fluorescens</i>	204 ab	64,2 b	88,4 c
Ab-V6 + <i>P. fluorescens</i>	187 b-d	60,2 bc	88,0 c
<i>B. subtilis</i>	193 b-d	55,4 bc	89,5 c
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	203 ab	51,9 bc	89,8 c
<i>Pantoea</i> sp.	186 b-d	49,5 c	89,7 c
Ab-V6 + <i>Pantoea</i> sp.	202 a-c	57,0 bc	111 ab
Valor de <i>P</i>	0,002	<0,0001	<0,0001
CV %	10,06	22,94	17,96

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

Tabela 6 – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MSR) e atividade das enzimas β -glicosidase e fosfatase ácida na rizosfera de plantas de milho inoculadas e coinoculadas com RPCPs em ensaios de segunda safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2021.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	β -glicosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol}$ $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Fosfatase ($\mu\text{g p-nitrofenol}$ $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Controle 0% de N	214	59,7	265 b	726 b
Controle 75% de N	195	51,9	261 b	704 b
Controle 100% de N	230	57,1	267 b	828 a
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	220	63,5	272 b	757 ab
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6) + <i>BiomaPhos</i> ®	235	64,8	252 b	739 b
<i>BiomaPhos</i> ® sementes + <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6) foliar	241	64,9	253 b	729 b
<i>R. tropici</i>	209	55,4	253 b	684 bc
Ab-V6 + <i>R. tropici</i>	191	52,4	315 a	765 ab
<i>B. subtilis</i>	176	48,2	223 c	615 c
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	229	61,7	276 b	693 bc
Valor de P	0,2387	0,5864	<0,0001	0,0007
CV %	18,87	23,22	10,12	9,92

*médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

As maiores produtividades (Figura 2a) no ensaio de milho primeira safra em Londrina foram obtidas nas plantas dos tratamentos que receberam inoculações com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *B. subtilis* CNPSO 2657, e na coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 com 8.318, 8.310 e 8.059 kg ha⁻¹ respectivamente, diferindo estatisticamente dos controles 0% e 100% da dose recomendada de N em cobertura para a cultura, sem diferir do controle 75% de N, com 7.380 kg ha⁻¹. As inoculações de *R. tropici* CIAT 899 e *Pantoea* sp. CNPSO 2798, assim como os controles 0% e 100% de N resultaram nas menores médias. Em decorrência de problemas com complexo de enfezamento, não foi possível efetuar a colheita no ensaio de primeira safra em Ponta Grossa. Já no ensaio de segunda safra (Figura 4a), em Londrina, todas as inoculações e coinoculações diferiram estatisticamente comparadas ao controle com 0% da dose de N (2619 kg ha⁻¹), com destaque para a inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *BiomaPhos*®, inoculação via sementes de *BiomaPhos*®

+ aplicação foliar de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), e coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 (3.799, 4.250, 3.990 e 3.749 kg ha⁻¹, respectivamente), que foram equivalentes ao controle com 100% de N.

Houve efeito dos tratamentos sobre o teor de N foliar e nitrogênio exportado pelos grãos de milho de primeira e segunda safra. Em Londrina, os teores de N na folha (Figura 2b) em todas as coinoculações e inoculações diferiram significativamente do controle não inoculado sem N (0%), e foram iguais estatisticamente ao controle não inoculado e com 100% de N. O *A. brasilense* em inoculação padrão (Ab-V5 + Ab-V6) ou coinoculação (Ab-V6) aumentou o teor de N das plantas em todos os tratamentos comparando ao controle não inoculado e com 75% de N, exceto para o tratamento coinoculado com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899. Já no ensaio conduzido em Ponta Grossa (Figura 3), todas as plantas que receberam inoculações e coinoculações diferiram dos controles não inoculados e com 0% e 75% de N em cobertura, com destaque para as coinoculações de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, em que houve diferença significativa em comparação ao controle não inoculado e com 100% de N em cobertura. No ensaio de segunda safra conduzido em Londrina (Figura 4b) todas as inoculações e coinoculações diferiram estatisticamente do controle não inoculado e com 0% de N, exceto o tratamento com inoculação de BiomaPhos® nas sementes + *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) via foliar.

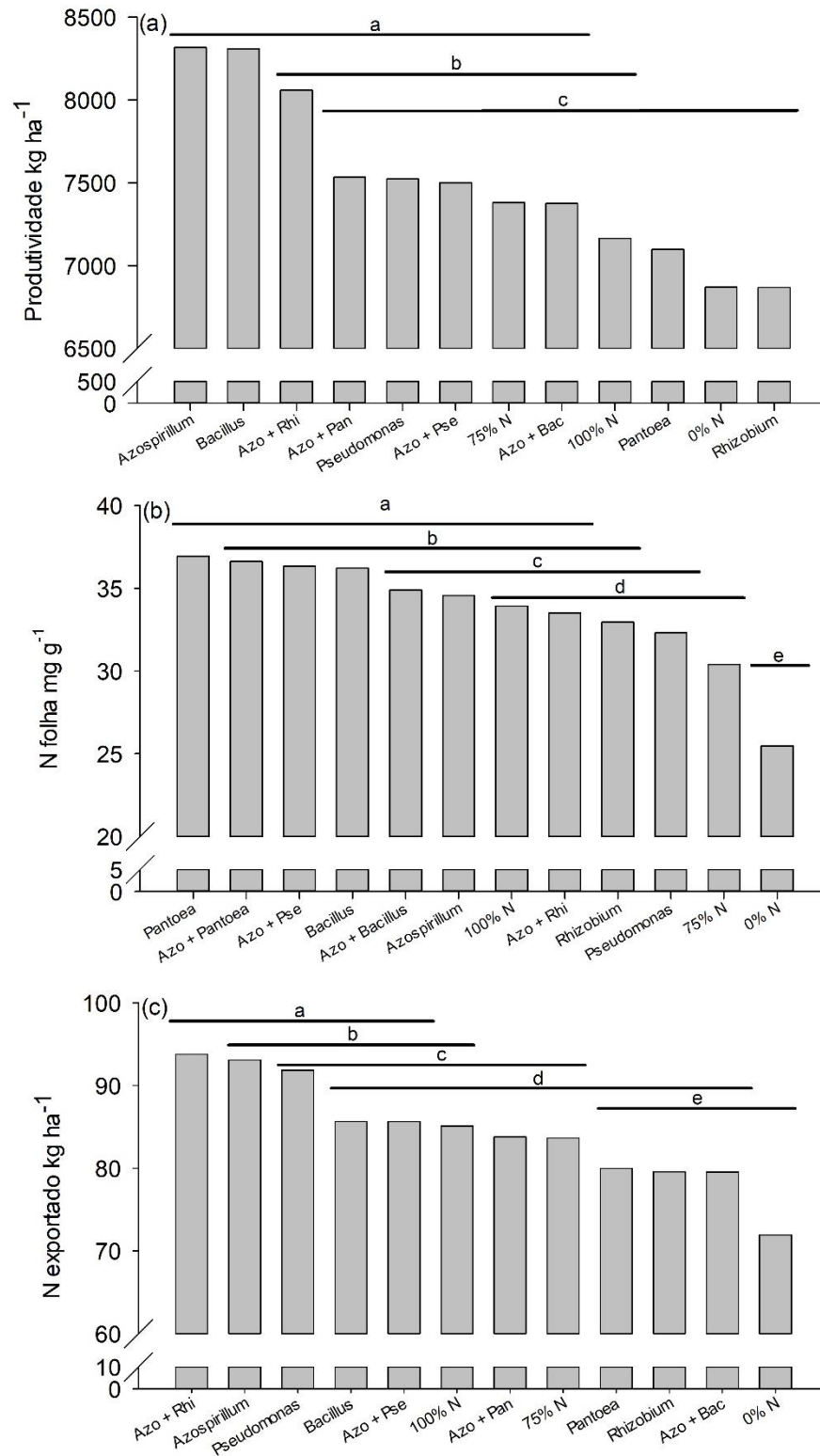
Para O N exportado nos grãos no ensaio de primeira safra em Londrina (Figura 2c) as plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 se destacaram das demais, diferindo estatisticamente dos controles não inoculados com 0% e 75% de N; a coinoculação também diferiu do controle com 100% de N em cobertura. O ensaio de Ponta Grossa apresentou problemas com complexo de enfezamento, impossibilitando a colheita dos grãos. Já no ensaio de segunda safra em Londrina (Figura 4c) todas as plantas inoculadas e coinoculadas diferiram do controle 0% de N, com destaque para a inoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + BiomaPhos® e inoculação via sementes com BiomaPhos® combinada com inoculação foliar de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), que foram iguais estatisticamente ao controle com 100% de N em cobertura.

Houve efeito significativo dos tratamentos no teor de P nas folhas (Figura 4d) e quantidade exportada pelos grãos (Figura 6e) no ensaio de segunda safra em Londrina – PR. As plantas que receberam inoculação padrão com *A.*

brasilense (Ab-V5 + Ab-V6) obtiveram os maiores teores de P nas folhas, diferindo estatisticamente dos controles não inoculados e com 0%, 75% e 100% de N em cobertura. Os demais tratamentos não diferiram dos controles.

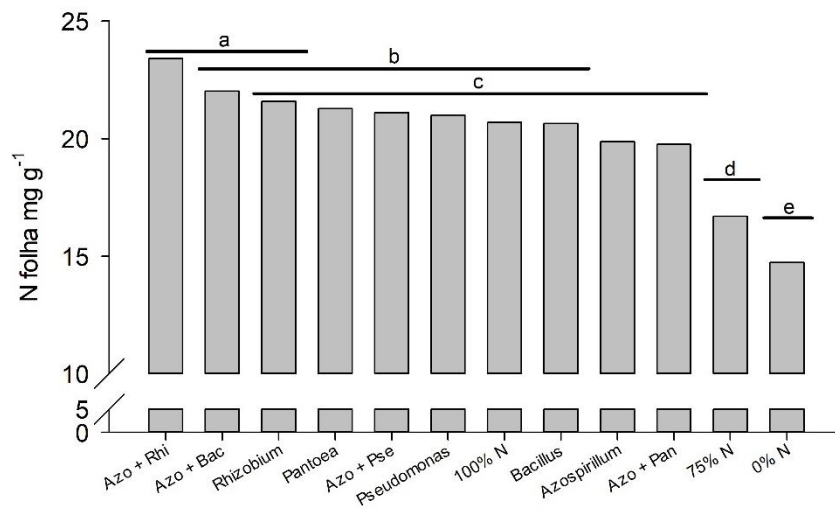
Já para a quantidade de P exportada nos grãos (Figura 4e), as plantas coinoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + BiomaPhos® diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, com média de 11,28 kg ha⁻¹; o restante das inoculações e coinoculações diferiram do controle não inoculado e com 0% de N em cobertura, que apresentou a menor exportação, 5,43 kg ha⁻¹ de P.

Figura 2 – Produtividade (a), Teor de nitrogênio foliar (b) e N exportado (c) por milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Pseudomonas = *P. fluorescens* CNPSO 2719; Azo + Pse = *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719; Bacillus = *B. subtilis* CNPSO 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657; *Pantoea* = *Pantoea* spp. CNPSO 2798; Azo + Pan = *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* spp. CNPSO 2798.



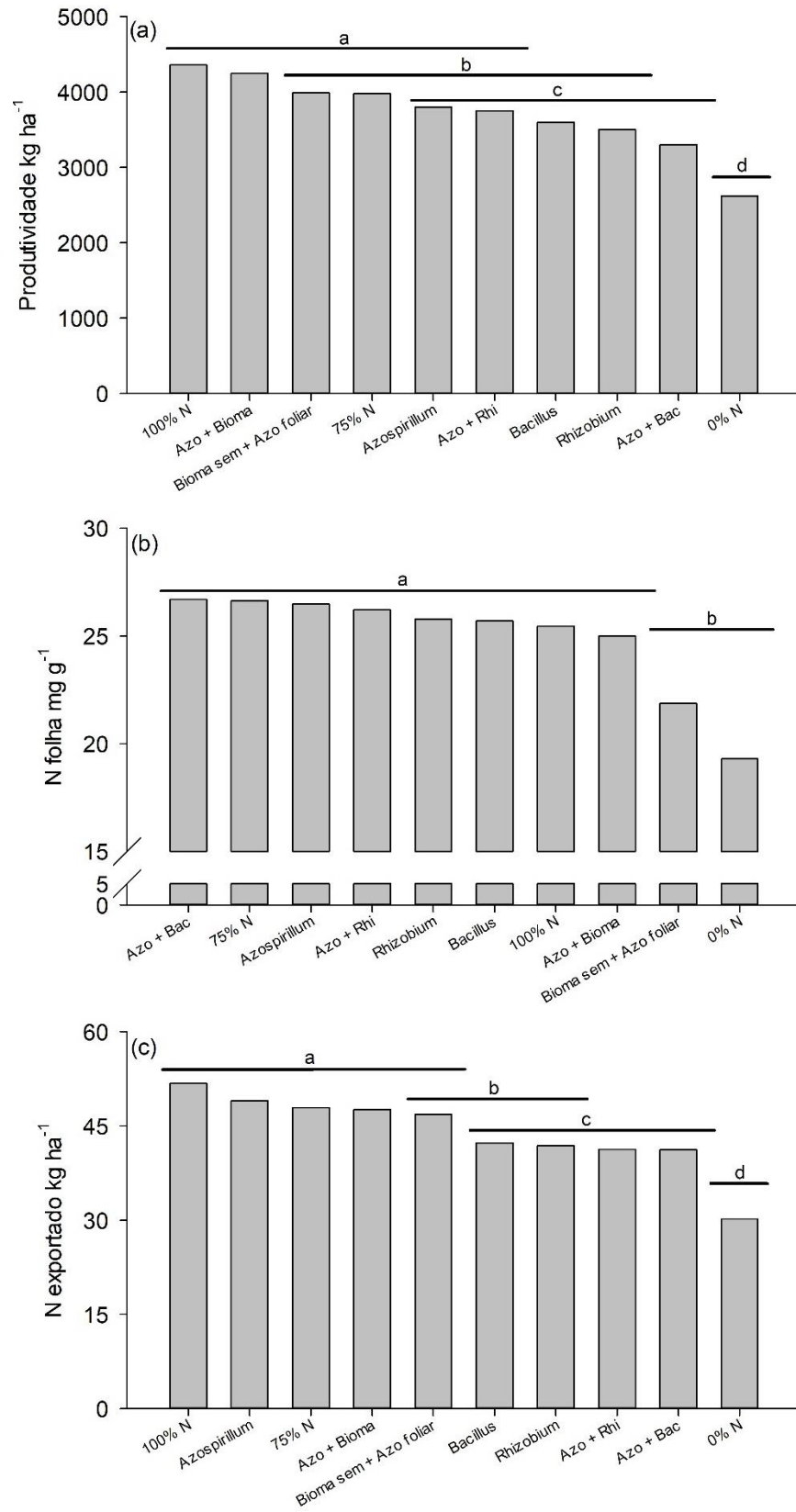
Médias sob barras de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

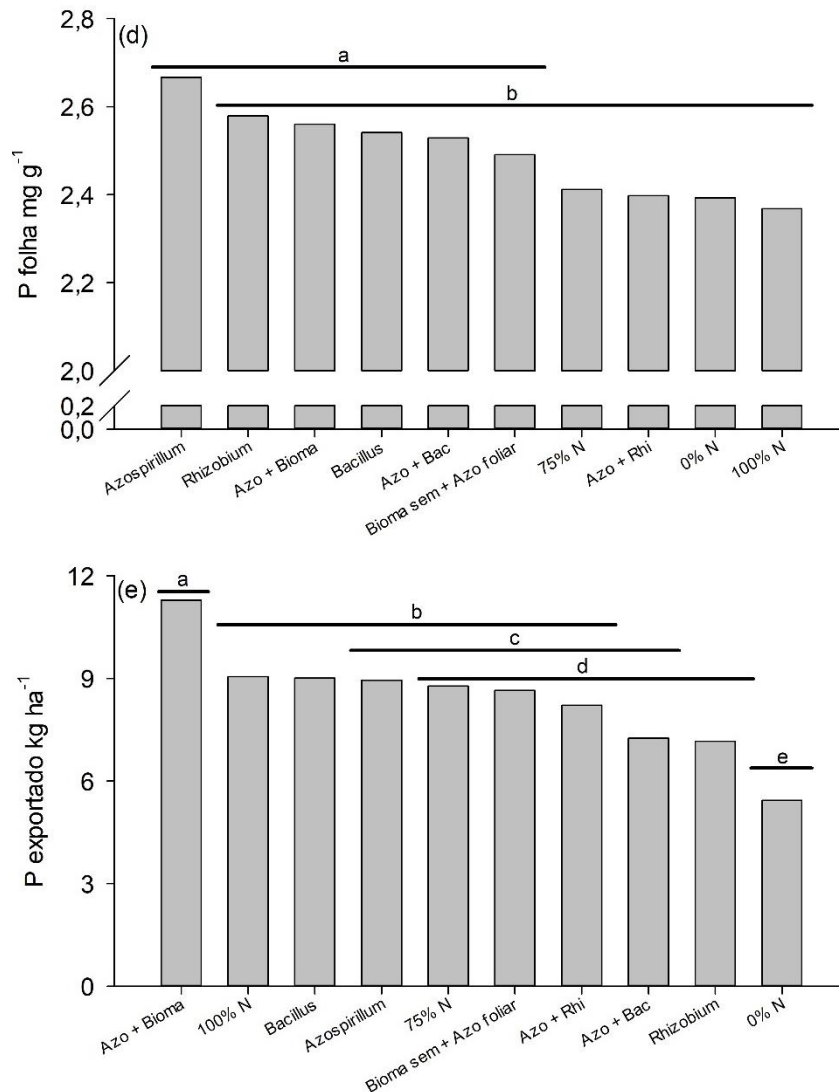
Figura 3 – Teor de N foliar em milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta Grossa. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Pseudomonas = *P. fluorescens* CNPSO 2719; Azo + Pse = *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719; Bacillus = *B. subtilis* CNPSO 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657; *Pantoea* = *Pantoea* spp. CNPSO 2798; Azo + Pan = *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* spp. CNPSO 2798.



*médias sob barras de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 4 – Produtividade (a), teor de N foliar (b), N exportado pelos grãos (c), teor foliar de P (d) e P exportado pelos grãos (e) de plantas de milho inoculadas ou coinoculadas com RPCPs em ensaio de segunda safra conduzido no município de Londrina no sistema Antecipe®. Safra 2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Azo + Bioma = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 + BiomaPhos®; Bioma sem + Azo foliar = BiomaPhos® inoculado nas sementes + inoculação foliar de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Bacillus = *B. subtilis* CNPSo 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657.





Médias sob linhas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Houve efeito significativo para todas as variáveis relacionadas à morfologia das raízes nos ensaios de primeira e segunda safra, exceto para CRS no ensaio de segunda safra. Para MRS no ensaio de primeira safra em Londrina (Tabela 7) as plantas coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSo 2798 obtiveram maiores médias ($0,199 \text{ g cm}^{-3}$) diferindo estatisticamente quando comparadas aos demais tratamentos e aos controles. Já em Ponta grossa (Tabela 8), a inoculação isolada de *R. tropici* CIAT 899 ($0,680 \text{ g cm}^{-3}$) e a associação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 ($0,649 \text{ g cm}^{-3}$ solo) se destacaram, diferindo estatisticamente dos controles não inoculados e com 0% e 100% da dose N em cobertura. No ensaio de segunda safra (Tabela 9) em Londrina, as plantas inoculadas com *B. subtilis* CNPSo 2657, *R. tropici* CIAT 899, e as coinoculações de *A. brasilense*

(Ab-V5 + Ab-V6) + BiomaPhos®, e *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657 obtiveram as maiores médias, porém sem diferir estatisticamente dos controles 0%, 75% e 100% de N em cobertura.

Para a variável CER as plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 no ensaio de primeira safra em Londrina (Tabela 7) se destacaram dos demais tratamentos, diferindo estatisticamente dos controles 0%, 75% e 100% de N em cobertura. Já no ensaio de Ponta Grossa (Tabela 8) a inoculação com *P. fluorescens* CNPSo 2718 se destacou em relação aos demais tratamentos. No ensaio de segunda safra conduzido em Londrina (Tabela 9) as coinoculações de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899, *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + BiomaPhos® e a inoculação isolada de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) resultaram nas maiores médias, diferindo dos controles 0%, 75% e 100% de N.

Com relação à variável DTR, no ensaio de primeira safra em Londrina (Tabela 7), as plantas inoculadas apenas com *B. subtilis* CNPSo 2657 obtiveram as maiores médias, diferindo dos controles 0%, 75% e 100% de N e da coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *P. fluorescens* CNPSo 2719, que apresentaram as menores médias. No ensaio conduzido em Ponta Grossa (Tabela 8), a inoculação apenas de *R. tropici* CIAT 899 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, exceto da coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) + *Pantoea* sp. CNPSo 2798 e da inoculação isolada de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6). Já as menores médias foram encontradas nos tratamentos não inoculados com 0% de N e na inoculação simples de *P. fluorescens* CNPSo 2719. Já no ensaio de segunda safra em Londrina (Tabela 9), as plantas do controle não inoculado e com 100% de N em cobertura se destacaram das que receberam inoculações e coinoculações, enquanto as menores médias ocorreram naquelas do controle não inoculado 0% de N e com a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899.

As plantas coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 no ensaio de primeira safra em Londrina (Tabela 7) obtiveram as maiores médias para DMR, e a inoculação de apenas *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) resultou na menor média, diferindo estatisticamente dos resultados dos demais tratamentos. No ensaio de Ponta Grossa (Tabela 8), as plantas do controle não inoculado e com 100% de N tiveram a maior média, diferindo estatisticamente de todas as inoculações simples (exceto com *B. subtilis* CNPSo 2657), e das coinoculações de *A. brasilense* Ab-V6 +

R. tropici CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657, que apresentaram menores médias. Já no ensaio de segunda safra em Londrina (Tabela 9) os controles não inoculados e com 0% e 75% de N em cobertura apresentaram médias estatisticamente maiores que os demais tratamentos, enquanto a inoculação isolada de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) resultou na menor média.

Tabela 7 – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento específico das raízes (CER), Densidade do tecido das raízes (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2020/2021.

Tratamentos	MRS (g cm ⁻³ solo)	CER (m g ⁻¹ raiz)	DTR (g cm ⁻³)	DMR (µm)
Controle 0% de N	0,108 bc	3,54 de	0,134 bc	1.418 bc
Controle 75% de N	0,089 bc	3,32 de	0,128 c	1.433 bc
Controle 100% de N	0,079 bc	4,24 cd	0,131 bc	1.345 bc
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	0,138 b	6,08 a	0,156 a-c	1.290 c
<i>R. tropici</i>	0,068 c	5,82 ab	0,134 bc	1.525 b
Ab-V6 + <i>R. tropici</i>	0,077 bc	2,79 e	0,151 a-c	1.771 a
<i>P. fluorescens</i>	0,050 c	3,17 de	0,162 a-c	1.390 bc
Ab-V6 + <i>P. fluorescens</i>	0,057 c	4,85 bc	0,148 bc	1.455 bc
<i>B. subtilis</i>	0,059 c	4,24 cd	0,199 a	1.360 bc
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	0,057 c	3,59 de	0,171 a-c	1.531 b
<i>Pantoea</i> sp.	0,095 bc	3,27 de	0,159 a-c	1.524 b
Ab-V6 + <i>Pantoea</i> sp.	0,199 a	3,46 de	0,180 ab	1.447 bc
Valor de P	<0,0001	<0,0001	0,0330	0,0013
CV %	67,44	32,39	26,76	13,33

*médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento específico de raízes (CER), Densidade do tecido as raízes no solo (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta Grossa - PR. Safra 2020/2021.

Tratamentos	MRS (g cm ⁻³ solo)	CER (m g ⁻¹ raiz)	DTR (g cm ⁻³)	DMR (µm)
Controle 0% de N	0,174 d	4,09 b	0,058 g	1.445 ab
Controle 75% de N	0,494 a-c	3,14 cd	0,194 d-f	1.363 a-c
Controle 100% de N	0,255 cd	3,38 b-d	0,181 ef	1.474 a
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	0,511 a-c	3,48 b-d	0,234 a-c	1.279 bc
<i>R. tropici</i>	0,680 a	2,85 d	0,261 a	1.375 a-c
Ab-v6 + <i>R. tropici</i>	0,649 ab	3,72 b-d	0,197 d-f	1.279 bc
<i>P. fluorescens</i>	0,344 b-d	5,86 a	0,167 fg	1.250 c
Ab-V6 + <i>P. fluorescens</i>	0,491 a-c	3,50 b-d	0,209 c-e	1.355 a-c
<i>B. subtilis</i>	0,489 a-c	3,10 d	0,216 b-d	1.367 a-c
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	0,355 b-d	4,06 bc	0,2057 c-e	1.218 c
<i>Pantoea</i> sp.	0,269 cd	4,22 b	0,182 ef	1.268 bc
Ab-V6 + <i>Pantoea</i> sp.	0,378 a-c	3,57 b-d	0,242 ab	1.310 a-c
Valor de P	0,0069	<0,0001	<0,0001	0,0434
CV %	60,36	26,32	19,11	10,66

*médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Massa de raízes secas (MRS), Comprimento de raízes no solo (CRS), Comprimento específico das raízes (CER), Densidade do tecido das raízes (DTR) e Diâmetro médio das raízes (DMR) de plantas inoculadas e coinoculadas com RPCPs em ensaios com milho segunda safra conduzidos em Londrina – PR, safra 2021.

Tratamentos	MRS (g cm ⁻³ solo)	CRS (cm cm ⁻³ solo)	CER (m g ⁻¹ raiz)	DTR (g cm ⁻³ solo)	DMR (µm)
Controle 0% de N	0,335 ab	0,082	2,91 de	0,182 c	1.516 a
Controle 75% de N	0,480 a	0,111	2,32 e	0,233 ab	1.586 a
Controle 100% de N	0,487 a	0,121	2,82 de	0,263 a	1.364 b-d
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	0,225 bc	0,094	4,14 b	0,191 bc	1.210 e
<i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6) + <i>BiomaPhos</i> ®	0,243 bc	0,107	4,02 bc	0,201 bc	1.305 b-e
<i>BiomaPhos</i> ® semente + <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6) foliar	0,464 a	0,151	3,51 b-d	0,215 bc	1.271 de
<i>R. tropici</i>	0,398 ab	0,131	2,95 de	0,216 bc	1.288 c-e
Ab-V6 + <i>R. tropici</i>	0,153 c	0,065	4,89 a	0,182 c	1.355 b-d
<i>B. subtilis</i>	0,347 ab	0,131	2,80 de	0,218 bc	1.409 b
Ab-V6 + <i>B. subtilis</i>	0,503 a	0,121	3,39 cd	0,214 bc	1.391 bc
Valor de <i>P</i>	0,0008	0,0674	<0,0001	0,0064	<0,0001
CV %	43,27	34,42	24,82	15,51	9,20

*médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

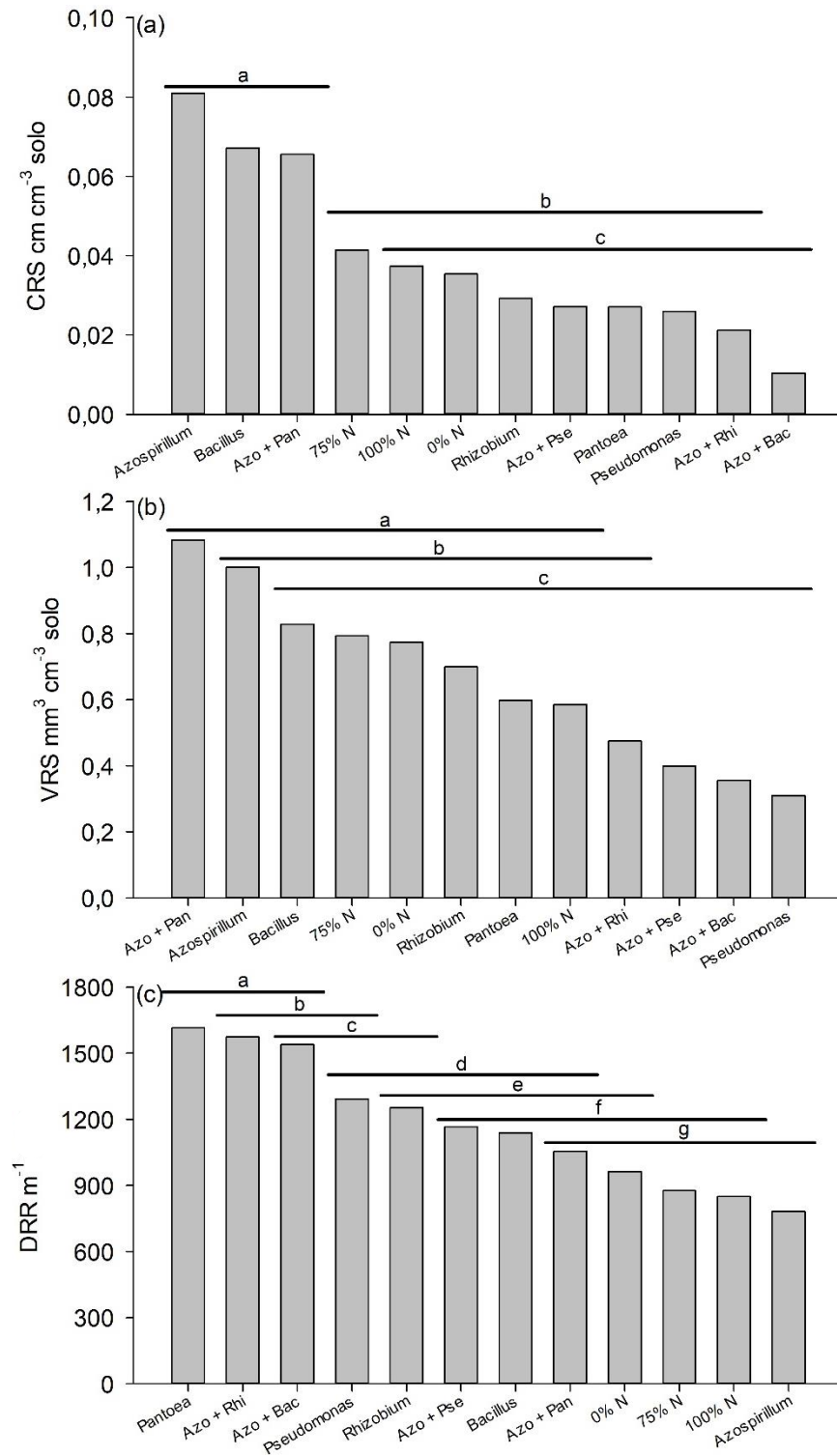
Para a variável CRS, no ensaio de primeira safra no município de Londrina (Figura 5a), as plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *B. subtilis* CNPSO 2657, e coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSO 2798 se destacaram com 0,081, 0,067 e 0,066 cm cm⁻³ solo, diferindo estatisticamente das plantas dos demais tratamentos. No ensaio conduzido em Ponta Grossa (Figura 6a) a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 e a inoculação de apenas *B. subtilis* CNPSO 2657 resultaram nas maiores médias com 0,256 e 0,210 cm cm⁻³ solo, respectivamente, com a coinoculação diferindo estatisticamente dos controles não inoculados, que apresentaram as menores médias, e dos demais tratamentos.

As plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSO 2798 se destacaram para VRS em Londrina (Figura 5b), porém não diferiram estatisticamente das plantas

dos controles não inoculados e com 0%, 75% e 100% de N. Já no ensaio conduzido em Ponta Grossa (Figura 6b) as maiores médias foram encontradas nas plantas coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719 com 1,87 e 1,72 mm³ cm⁻³ solo, que diferiram estatisticamente dos controles não inoculados, com 0% e 100% de N, porém não diferiram do controle com 75% da dose de N. No ensaio conduzido na segunda safra em Londrina (Figura 7a) todas as inoculações e coinoculações diferiram estatisticamente do controle não inoculado e 0% de N, com destaque para os tratamentos com *B. subtilis* CNPSO 2657 e a inoculação via sementes de BiomaPhos® + aplicação foliar de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6).

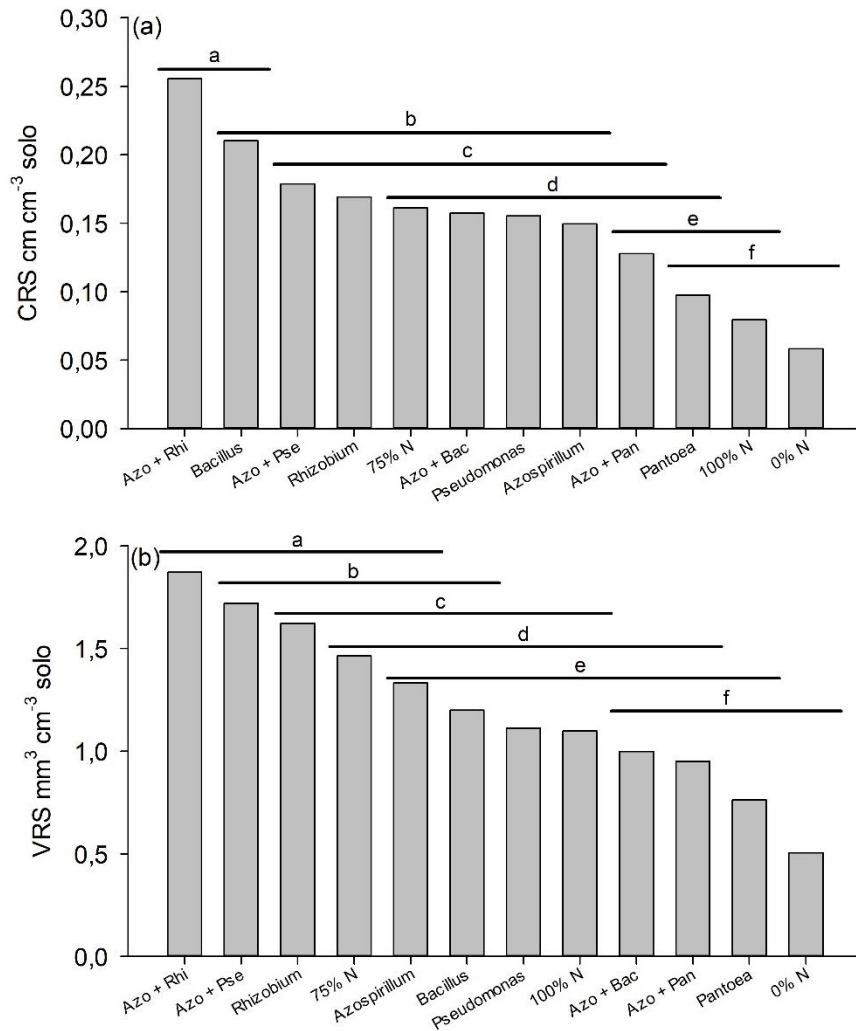
Para DRR, no ensaio de primeira safra em Londrina (Figura 5c), as inoculações simples de *Pantoea* sp. CNPSO 2798 e *P. fluorescens* CNPSO 2719 (1615 e 1292 ramificações m⁻¹, respectivamente) e as coinoculações de *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657 (1574 e 1540 m⁻¹, respectivamente) diferiram estatisticamente dos controles não inoculados com 0%, 75% e 100% de N, e da inoculação de apenas *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6). Já no ensaio de Ponta grossa (Figura 6c) as plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) tiveram as maiores médias, com 1327 ramificações m⁻¹, diferindo estatisticamente dos controles não inoculados e com 0%, 75% e 100% de N, das inoculações com *B. subtilis* CNPSO 2657 e com *Pantoea* sp. CNPSO 2798 e da coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* sp. CNPSO 2798, que também se destacaram com 1191, 1189 e 1186 m⁻¹, respectivamente. No ensaio de segunda safra em Londrina (Figura 7b) todas as inoculações e coinoculações diferiram dos controles, exceto a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657 e a inoculação nas sementes de BiomaPhos® + inoculação foliar de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), a qual diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, com 1449 ramificações m⁻¹.

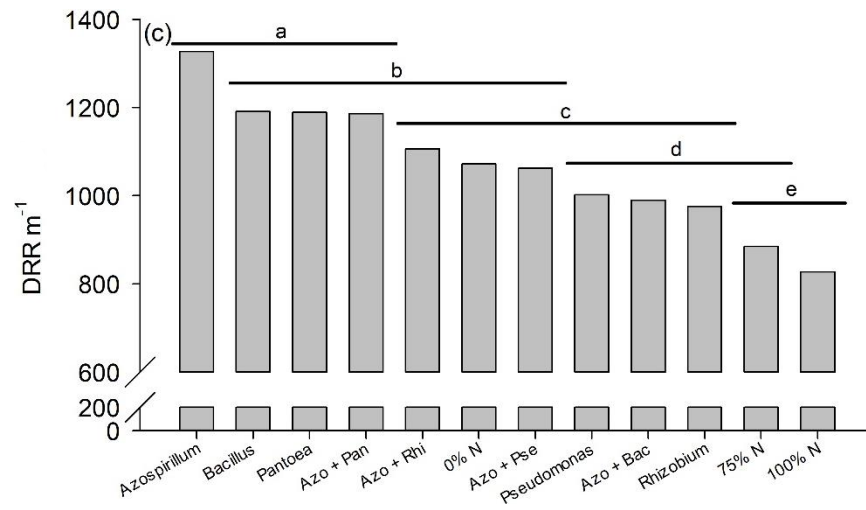
Figura 5 – Comprimento de raízes no solo (a), Volume de raízes no solo (b) e Densidade de ramificações nas raízes (c) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Pseudomonas = *P. fluorescens* CNPSO 2719; Azo + Pse = *A. brasilense* Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSO 2719; Bacillus = *B. subtilis* CNPSO 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSO 2657; *Pantoea* = *Pantoea* spp. CNPSO 2798; Azo + Pan = *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* spp. CNPSO 2798.



Médias sob linhas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

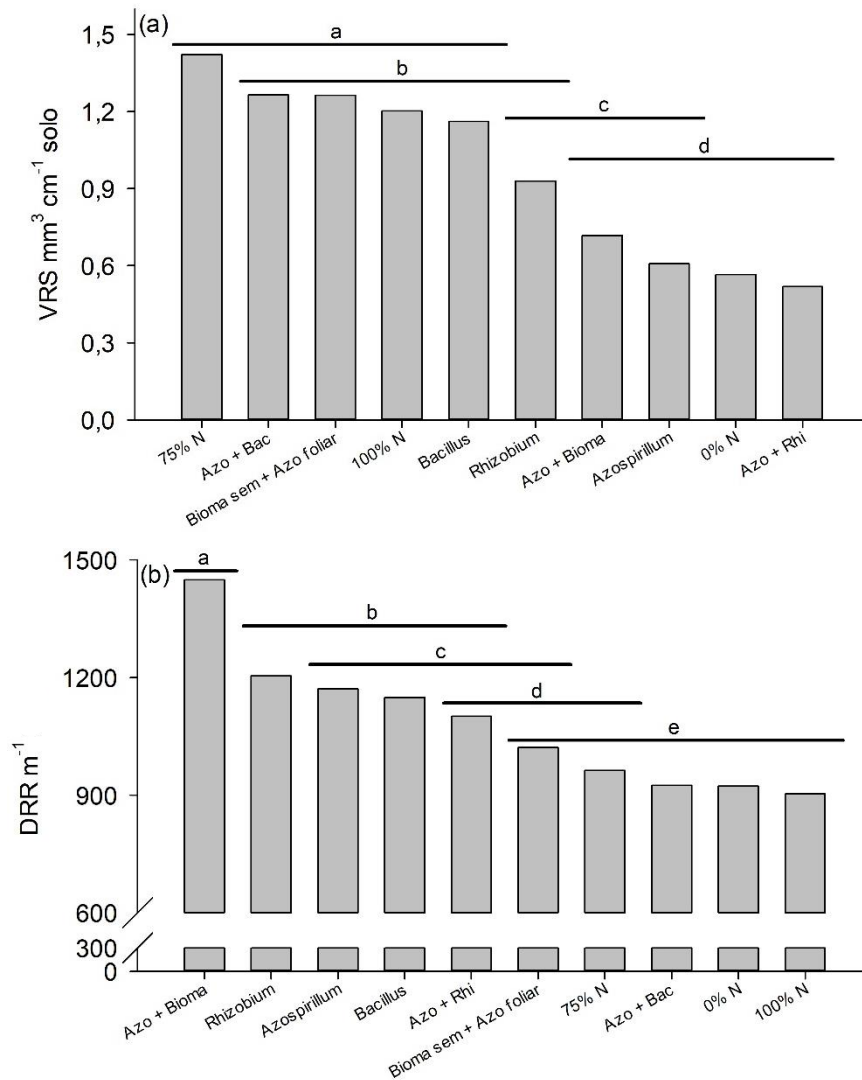
Figura 6 – Comprimento de raízes no solo (a), Volume de raízes no solo (b) e Densidade de ramificações nas raízes (c) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de primeira safra conduzido no município de Ponta grossa - PR. Safra 2020/2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Pseudomonas = *P. fluorescens* CNPSo 2719; Azo + Pse = *A. brasilense* estirpe Ab-V6 + *P. fluorescens* CNPSo 2719; Bacillus = *B. subtilis* CNPSo 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657; *Pantoea* = *Pantoea* spp. CNPSo 2798; Azo + Pan = *A. brasilense* Ab-V6 + *Pantoea* spp. CNPSo 2798.





Médias sob linhas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 7 – Volume de raízes no solo (a) e Densidade de ramificações nas raízes (b) de milho inoculado ou coinoculado com RPCPs em ensaio de segunda safra conduzido no município de Londrina - PR. Safra 2021. 0% N = controle 0% da dose de N em cobertura; 75% N = controle 75% da dose de N em cobertura; 100% N = controle 100% da dose de N em cobertura; Azospirillum = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Azo + Bioma = *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 + BiomaPhos®; Bioma sem + Azo foliar = BiomaPhos® inoculado na semente + aplicação foliar de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6; Rhizobium = *R. tropici* CIAT 899; Azo + Rhi = *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899; Bacillus = *B. subtilis* CNPSo 2657; Azo + Bac = *A. brasilense* Ab-V6 + *B. subtilis* CNPSo 2657.



Médias sob linhas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

Grande parte dos estudos com inoculação de RPCPs na cultura do milho indica uma melhoria geral do sistema de raízes, porém sem informações sobre características morfológicas específicas como as investigadas neste trabalho. No ensaio de primeira safra conduzido em Londrina, a inoculação isolada de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e a combinação de *A. brasilense* Ab-V6 com *Pantoea* sp. CNPSo 2798 aumentou a massa de raízes secas e volume de raízes no solo, enquanto que em Ponta Grossa a inoculação simples de *R. tropici* CIAT 899 e sua combinação com *A. brasilense* Ab-V6 se destacaram. Já no ensaio de segunda safra, os melhores resultados foram observados nas plantas inoculadas com *B. subtilis* CNPSo 2657 e sua combinação com *A. brasilense* Ab-V6, sendo equivalente ao controle com 100% de N. Embora o aumento de algumas dessas características possa representar investimento em C da planta para a construção de raízes, não é considerado um bom indicador do potencial radicular para aquisição de recursos do solo (Eissenstat, 1991; Comas et al., 2012), por isso a análise mais detalhada de características morfológicas pode auxiliar a explicar o melhor desempenho das plantas e maior exportação de nutrientes pelos grãos nas inoculações mais eficientes.

A inoculação de *B. subtilis* (estirpe CNPSo 2657 e BiomaPhos®), *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e *Pantoea* sp. CNPSo 2798 aumentou o comprimento de raízes no solo e a densidade de ramificações das raízes das plantas de milho cultivado tanto na primeira quanto na segunda safra, indicando que estas características morfológicas são consistentemente alteradas, independente da época de cultivo. A habilidade de algumas RPCPs na produção de auxinas que estimulam a atividade do meristema radicular, alongamento celular, e o aumento de ramificações já foi reportada por diversos autores (BARBIERI; GALLI, 1993; DUCA, et al. 2014; MAHESHWARI, et al. 2015; CASSÁN, et al. 2020; RONDINA, et al. 2020). No caso de *A. brasilense*, além da produção de fitormônios, a bactéria produz e libera NO, que age como sinalizador em uma cascata de eventos mediados por hormônios que estimula o desenvolvimento de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006). Já outras BPCPs, como *P. fluorescens*, podem produzir ciclopeptídeos que regulam genes responsivos à auxina nas raízes, podendo ser um mecanismo chave pelo qual esses microrganismos modulam a morfologia das raízes das plantas (ORTIZ-CASTRO et al., 2020). Em todo caso, raízes maiores e mais ramificadas têm

capacidade de explorar mais eficientemente maiores volumes de solo, resultando em maior aproveitamento da água e absorção de nutrientes pelas plantas (HODGE, 2004; YORK et al., 2013). Além disso, o aumento da distribuição das raízes no solo pode ajudar as plântulas a se estabelecerem mais rapidamente e sobreviverem sob condições limitantes de água e nutrientes (YORK et al., 2013; WHITE, 2019). Em ensaio conduzido com braquiária (*Urochloa* spp.), Hungria et al. (2021) observaram que a inoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e *P. fluorescens* CNPSo 2799 aumentou o comprimento total de raízes e o número de ramificações, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

O maior comprimento específico permite a exploração de maior volume de solo e melhor aquisição de nutrientes por unidade de C investida na construção de raízes (COMAS et al., 2012; KRAMER-WALTER et al., 2016). Resultados quanto ao comprimento específico radicular mostraram comportamentos distintos nos ensaios. Em Londrina na primeira safra, a inoculação isolada de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e *R. tropici* CIAT 899 resultou em maiores valores, enquanto em Ponta Grossa as inoculações com maiores resultados para essa variável foram de *P. fluorescens* CNPSo 2719 e *Pantoea* sp. CNPSo 2798. Na segunda safra, a inoculação de *A. brasilens* (Ab-V5 + Ab-V6) e a combinação *A. brasilense* Ab-V6 com *R. tropici* CIAT 899 resultou nas maiores médias. Raízes com menor diâmetro e elevada ramificação podem explorar microssítios do solo com maior disponibilidade de nutrientes, especialmente aqueles com menor mobilidade, como é o caso do P (HOLDAWAY et al., 2011). No presente trabalho, as inoculações com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e *P. fluorescens* CNPSo 2719 resultou em raízes de menor diâmetro e menor densidade do tecido radicular. Raízes com menor densidade possuem maior taxa de crescimento e permitem aquisição mais rápida de recursos, o que proporciona à planta rápida expansão da área foliar com baixo investimento em matéria seca (GARNIER; LAURENT, 1994), gerando benefícios que irão auxiliar no estabelecimento e sobrevivência de plantas jovens.

A produção de hormônios vegetais (auxinas, giberilinas e citocininas) pode ser apontada como principal explicação para os resultados apresentados quanto ao maior desenvolvimento radicial, visto que estas RPCPs têm capacidade de produção de tais fitormônios (MEHNAZ, 2015). A produção de auxinas, em especial o ácido indol-3-acético (AIA) promove mudanças no controle do crescimento celular, levando ao aumento do volume, ramificação e comprimento das raízes, em especial

nos estágios iniciais da cultura (CASSÁN et al., 2014). Há relatos ainda da produção de NO por essas bactérias, que age como sinalizador em uma cascata de eventos mediados por hormônios que estimula o desenvolvimento de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006). Estes benefícios têm influência direta no acúmulo de biomassa, devido à maior capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta (KOUCHEBAGH et al. 2012), como foi observado em trabalhos de Fukami et al. (2016) e Ribeiro et al. (2022), em que a inoculação com estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* resultou em aumento da MPAS e MRS comparado aos controles sem inoculação.

A inoculação ou coinoculação com RPCPs aumentou o teor de N foliar em comparação ao controle não inoculado e com 75% de N em cobertura nos ensaios de primeira safra, na maioria dos casos. Algumas RPCPs têm capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o a uma forma assimilável por plantas e microrganismos, melhorando assim a nutrição nitrogenada da cultura (SAIKIA et al., 2012). Porém a quantidade de N fixada e disponibilizada por essas bactérias não é suficiente para suprir a necessidade da cultura (DÍAZ-ZORITA; FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009), o que faz necessária a suplementação de N mineral. Em trabalho realizado por Cohen et al. (1980), houve aumento dos teores de N na folha de milho em 118% pela inoculação de *A. brasilense*, corroborando os resultados obtidos, que chegaram a 59% de aumento na coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 com *R. tropici* CIAT 899 no ensaio de primeira safra conduzido em Ponta Grossa. Entretanto, esse aumento nos teores pode não ser necessariamente resultado da FBN, mas pode ter sido pelo aumento da eficiência de uso do fertilizante nitrogenado devido aos efeitos positivos da arquitetura das raízes das plantas, como será discutido adiante.

Além de melhorar a condição nutricional das plantas quanto ao N, algumas RPCPs podem mobilizar fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade da matriz mineral e/ou orgânica do solo, aumentando a disponibilidade de P para a absorção pelas plantas (LYU et al., 2016). Neste trabalho, houve aumento no teor foliar de P pela inoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e quando combinado com o produto comercial BiomaPhos® (*B. subtilis* e *B. megaterium*) no milho cultivado em segunda safra. Os isolados de *Bacillus* que compõem o segundo produto são reconhecidamente mobilizadores de P, seja pela mineralização produzindo fosfatases, ou na solubilização pela produção de ácidos orgânicos (PAIVA et al., 2020; RIBEIRO et al., 2018). A produção de ácidos orgânicos, compostos de baixo peso

molecular que quelam cátions ligados às moléculas de P, libera o P em formas solúveis para as plantas (ARCHANA; BUCH; KUMAR, 2012). Este processo de liberação de ácidos orgânicos também promove a acidificação do solo, auxiliando na liberação de P de complexos de ferro, alumínio e cálcio de baixa solubilidade (MENDES et al., 2014; LI et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães et al. (2021), em que a inoculação de BiomaPhos® com apenas 50% da dose recomendada de P aumentou o teor de P nas folhas de milho em 36% comparado ao tratamento com 100% da dose recomendada de P. Já em ensaio conduzido por Ribeiro et al. (2022), a coinoculação de *Bacillus* sp. com *A. brasilense* apresentou um aumento de 31% no teor de P na folha em relação ao controle não inoculado.

No presente trabalho, as plantas inoculadas com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e coinoculadas com *A. brasilense* Ab-V6 e *R. tropici* CIAT 899 na primeira safra se destacaram dos demais tratamentos quanto ao N exportado nos grãos, enquanto no ensaio de segunda safra os tratamentos com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e a coinoculação de *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) com BiomaPhos® resultaram nas maiores exportações de N e de P pelos grãos. Os valores de exportação de nutrientes dependem do teor no grão e da produtividade. Nos dois ensaios em que foi possível realizar a colheita, as inoculações e coinoculações aumentaram as exportações destes nutrientes, com destaque para as inoculações com *A. brasilense* e *B. subtilis* CNPSo 2657.

O maior acúmulo de nutrientes bem como maiores produtividades são reflexos de uma combinação de diversos fatores, dentre eles a FBN (SAIKIA et al., 2012), a produção de fitormônios que reflete na melhor arquitetura radicular (MEHNAZ, 2015; CASSÁN et al., 2014) que leva à maior capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta (KOUCHEBAGH et al. 2012), a solubilização de fosfatos que leva à absorção de P (ARCHANA; BUCH; KUMAR, 2012; MENDES et al., 2014; LI et al., 2015), ao biocontrole de patógenos pela produção de compostos sideróforos (GANESHAN; KUMAR, 2005; DAS et al., 2007), a atenuação de estresses abióticos como seca e salinidade (RODRÍGUEZ-SALAZAR et al., 2009), auxílio na defesa contra excesso de intensidade luminosa (BASHAN et al., 2006), e fitorremediação de solos contaminados (TUGAROVA et al., 2014). Diversos trabalhos atestaram a eficiência da inoculação de RPCPs no aumento de produtividade na cultura do milho, mesmo com diminuição da quantidade de N aplicada em cobertura, como observado

por Fukami et al. (2016), em que a inoculação do milho com *A. brasilense* e fornecimento de 75% da dose recomendada de N em cobertura resultou em um aumento de 555 kg ha⁻¹ na produtividade comparado ao controle 0% de N e se igualando ao controle não inoculado que recebeu 100% de N. Dartora et al. (2016) demonstraram que a inoculação de uma estirpe de *Rhizobium* sp. associada a 30 kg ha⁻¹ de N na cultura do milho foi equivalente à fertilização com 160 kg ha⁻¹ do nutriente no tratamento sem inoculação. Já em estudo conduzido por Sandini et al. (2019), os efeitos atribuídos a *P. fluorescens* resultaram em ganhos em produtividade entre 29 e 31% comparados com as planas de milho não inoculadas, em que a promoção de crescimento e o aumento no rendimento foram equivalentes à aplicação de 100% da dose recomendada do fertilizante nitrogenado, mesmo quando a dose do fertilizante foi reduzida em 25% nos tratamentos inoculados, sem comprometer o rendimento. De Sousa et al. (2020) confirmaram os efeitos positivos da inoculação de estirpes de *Bacillus* sp. na cultura do milho, com incremento de produtividade de grãos em 21% e acúmulo de P nos grãos em 58%, atribuindo os resultados à produção de AIA e solubilização de fosfato pelos microrganismos inoculados.

A saúde do solo também pode ser relacionada com melhorias na produtividade das culturas. A estrutura da comunidade microbiana e as atividades enzimáticas no solo são índices para avaliação da saúde e qualidade do solo, sendo muito importantes por desempenhar funções ligadas aos ciclos biogeoquímicos do C, P e N, por exemplo, podendo fornecer informações sobre a atividade biológica do solo que atua na degradação de moléculas orgânicas complexas e/ou de moléculas orgânicas simples, disponibilizando nutrientes para os demais microrganismos e plantas no meio (DI SALVO et al., 2018; HAYAT et al., 2012; MARTINEZ et al., 2007; SILVEIRA, 2007). Em estudos sobre a comunidade microbiana, o impacto ecológico que pode ser causado pela inoculação de RPCPs exógenas ao ambiente natural deve ser considerado como um aspecto importante, pois a inoculação desses microrganismos pode impactar as populações nativas, resultando em aumento ou diminuição nas atividades dos microrganismos na rizosfera (BHARTI et al., 2015; LI et al., 2018). Nos resultados obtidos neste trabalho, em todos os tratamentos em que foi inoculada uma bactéria diferente de *A. brasilense* houve redução da atividade da enzima β -glicosidase nos ensaios de milho primeira safra, exceto na coinoculação com *Pantoea* sp. CNPSO 2798 em Ponta Grossa. Já no ensaio de segunda safra, o tratamento coinoculado com *A. brasilense* Ab-V6 + *R. tropici* CIAT 899 foi observado

aumento da atividade da enzima, diferindo dos demais tratamentos. Para a enzima fosfatase ácida, não houve efeito das inoculações em comparação aos tratamentos não inoculados. Em trabalho conduzido por Chaudhary et al. (2020) a inoculação de RPCPs em plantas de *Arthrocnemum indicum* não influenciou a atividade da enzima β -glicosidase, porém houve aumento da atividade da fosfatase ácida em relação à testemunha não inoculada. Abdelkrim et al. (2020) encontraram relação positiva com a inoculação de RPCPs e o aumento da atividade da β -glicosidase e da fosfatase ácida em comparação com o controle não inoculado em plantas de *Lathyrus sativus*. Poucos trabalhos são desenvolvidos relacionando a inoculação de BPCPs com a atividade dessas enzimas, principalmente em culturas consideradas *commodities*, como a soja e o milho, sendo assim necessários mais trabalhos para que se possa averiguar com mais detalhes a relação entre inoculação de BPCPs com a ação destas enzimas na rizosfera.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação com RPCPs, especialmente *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *R. tropici* CIAT 899 e *B. subtilis* (CNPSO 2657 e BiomaPhos®) mostrou-se favorável aos aspectos agrônômicos avaliados de acúmulo de biomassa aérea e radicial, acúmulo de nutrientes e produtividade, tendo sido capazes de substituir 25% a adubação nitrogenada de cobertura, abrindo perspectivas para a redução de dose da adubação nitrogenada.

Nos ensaios conduzidos em primeira safra, a inoculação de RPCPs não alterou a atividade da enzima β -glicosidase, já no ensaio de segunda safra a coinoculação de *A. brasilense* Ab-V6 com *R. tropici* CIAT 899 propiciou aumento da atividade com relação aos controles. A inoculação não resultou em aumento da atividade da fosfatase ácida no ensaio conduzido em segunda safra, assim ainda deixando dúvidas quanto à influência das RPCPs na atividade enzimática na rizosfera.

A inoculação e coinoculação do milho com RPCPs é efetiva em melhorar características morfológicas das raízes, incluindo aumento da massa das raízes secas, volume, comprimento total e específico, densidade de ramificações, e diminuição do diâmetro médio das raízes, o que possibilita melhor aproveitamento de água e nutrientes do solo.

Dentre as inoculações e coinoculações, os tratamentos com inoculação isolada da estirpe *B. subtilis* CNPSO 2657, e a associação de *R. tropici* CIAT 899 com *A. brasilense* Ab-V6 apresentaram maior potencial de promoção de crescimento do milho, sendo igual ou superior em diversas variáveis, quando comparado a inoculação isolada do padrão comercial com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*.

Este trabalho mostra que a inoculação e a coinoculação de RPCPs é viável para a melhora das condições de crescimento e desenvolvimento da cultura do milho, levando ao aumento de produtividade com possibilidade de redução da adubação nitrogenada, reduzindo os custos econômicos e ambientais da produção.

REFERÊNCIAS

- ABDELKRIM, S.; JEBARA, S.; SAADANI, O.; ABID, G.; TAAMALLI, W.; ZEMNI, H.; MANNAI, K.; LOUATI, F.; MOEZ, J. In situ effects of *Lathyrus sativus*- PGPR to remediate and restore quality and fertility of Pb and Cd polluted soils. **Ecotoxicology and environmental safety**. 192. 2020. 10.1016/j.ecoenv.2020.110260.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. **Soil Science**, v. 125, n. 5, p. 331, 1978.
- AL-KHAFAJI, A. A.; TABATABAI, M. A. Effects of trace elements on arylsulfatase activity in soils. **Soil Science**, v.127, p.129-133, 1979.
- ANPII—Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Congresso debate microrganismos no futuro da lavoura, 2016. [Http://www.anpii.org.br/congresso-debate-microrganismos-no-futuro-dalavoura](http://www.anpii.org.br/congresso-debate-microrganismos-no-futuro-dalavoura). Acesso em 18 de agosto de 2021.
- ARCHANA, G.; BUCH, A.; KUMAR, G. N. Pivotal role of organic acid secretion by rhizobacteria in plant growth promotion. In: Satyanarayana, T., Johri, B. N., Anil P. Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology. **Springer Netherlands**, 2012. p. 35-53. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 35-53.
- ATIENO, M.; HERRMANN, L.; OKALEBO, R.; LESUEUR, D. Efcieny of diferent formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and efect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two diferent strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World J Microbiol Biotechnol** 28:2541–2550, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062-x>
- BACTERIO. 2017. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em julho de 2020.

- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183-196, 2018.
- BAKSHI, M.; VARMA, A. Soil enzyme: the state-of-art. In: Shukla G, Varma A (ed) **Soil enzymology**. Springer-Verlag, Berlin, pp 1–24, 2011.
- BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Res Microbiol** 144: 69–75, 1993. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90216-O](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90216-O)
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J. P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 279–285, 2006.
- BASHAN, Y.; DE BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In: Singh H, Sarma B, Keswani C (eds) **Agriculturally important microorganisms**. Springer, Singapore, pp 15–46, 2016.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, 108:77–136, 2010.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant soil** 378:1–33, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- BELL, T.; NEWMAN, J. A.; SILVERMAN, B. W.; TURNER, S. I. LILEY, A. K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature**. 436, 1157-60, 2005.

- BHARTI, N.; BARNAWAL, D.; MAJI, D.; KALRA, A. Halotolerant PGPRs prevent major shifts in indigenous microbial community structure under salinity stress. **Microb. Ecol.** 70, 196–208, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0557-4>.
- BJELIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; TINTOR, B.; MRKOVAČKI, N. Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 1, p. 88-98, 2018.
- BOLLAG, J. M.; MERTZ, T.; OTJEN, L. Role of Microorganisms in Soil Bioremediation. **ACS Symposium Series**, 2–10, 1994.
- BOSSIS, E. LEMANCEAU, P.; LATOUR, X.; GARDAN, L. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. **Agronomie, EDP Sciences**, 20 (1), pp.51-63, 2000.
- BÜNEMANN, E. K.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R. E.; DE DEYN, G.; DE GOEDE, R.; BRUSSAARD, L. Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, 120, 105–125, 2018.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Rev Bras Ciênc Solo** 34:1103–1112, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400010>
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba, São Paulo. 2016, 221p
- CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; CARLAN, C. L. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E.; DÍAZZORITA, M.; DE-BASHAN, L.; MORA, V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biol Fertil Soils** 56:461–479, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>

- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.
- CASSÁN, F. D., OKON, Y., CREUS, C.M. Handbook for *Azospirillum*. Springer **International Publishing**, Cham, pp. 435–445, 2015.
- CASTRO, J. R. P. Inoculação – uma prática essencial. *In*: OUTLOOK. **Globalfert 2020**. Globalfert, p.120-124, 2020.
- CHAUDHARY, D. R.; RATHORE, A. P.; SHARMA, S. Effect of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria inoculation on soil microbial community structure and nutrients. **Applied Soil Ecology**, 150, 2020. doi:10.1016/j.apsoil.2019.103461
- COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I.; HENIS, Y. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen fixing *Azospirillum* spp. **Plant Physiol.** 66:746–9, 1980.
- COMAS, L. H.; MUELLER, K. E.; TAYLOR, L. L.; MIDFORD, P. E.; CALLAHAN, H. S.; BEERLING, D. J. Evolutionary patterns and biogeochemical significance of angiosperm root traits. *Int J Plant Sci* 173:584–595, 2012. <https://doi.org/10.1086/665823>
- COMPANT, S.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SESSITSCH, A. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. **FEMS Microbiol Ecol** 73(2):197–214, 2010.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 8 Safra 2020/21 – Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-97, 2021.
- CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA D. D.; MACHADO, J. R. de A.; COTA L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M.

Milho: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 45p. Nota técnica.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 581–588, 2006.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Mol Plant Pathol**. 10:325–35, 2009.

CRUSCIOL, C. A. C.; SORATTO, R. P.; BORGHI, E.; MATEUS, G. P. Benefits of integrating crops and tropical pastures as systems of production. **Better crops**, v. 94, n. 2, p. 14-16, 2010.

DARDANELLI, M. S.; DE CÓRDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DÍAZ, M. E. S.; SER-RANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod Factor production under salt stress. **Soil Biol Biochem** 40:2713–2721, 2008

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MENEZES, C. R. J. Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bacteria. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n.7, p.606-611, 2016.

DAS, A.; PRASAD, R.; SRIVASTAVA, A.; GIANG, P. H.; BHATNAGAR, K.; VARMA, A. Fungal siderophores: structure, functions and regulations. In: Varma, A., Chincholkar, S.B. (Eds.), **Microbial Siderophores**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1–42, 2007.

DASTAGER, S. G.; DEEPA, C. K.; PUNEET, S. C.; NAUTIYAL, C. S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growthpromoting strain *Pantoea* NII-186. **From Western Ghat forest soil**, India. **Lett Appl Microbiol** 49:20–25, 2009.

- DATTA, A.; SINGH, R. K.; KUMAR, S.; KUMAR, S. An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium "*Rhizobium*": a review. **Annals of Plant Sciences**, p. 933– 942, 2014.
- DAVID, B. V.; CHANDRASEHAR, G.; SELVAM, P. N. *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**, 221–243, 2018.
- DE MORAIS, T. P.; DE BRITO, C. H.; BRANDÃO, A. M.; REZENDE, W. S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016.
- DE SOUSA, S. M.; DE OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, D. L.; DE CARVALHO, C. G.; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. P.; GOMES, E. A. Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. **Journal of Plant Growth Regulation**. 2020.
- DEMARCHI, M. Análise da Conjuntura Agropecuária Safra 2011/12: Milho. **SEAB – DERAL**. Curitiba. 14p. 2011.
- DEN HERDER, G.; VAN ISTERDAEL, G.; BEECKMAN, T.; DE SMET, I. The roots of a new green revolution. **Trends in Plant Science**, 15: 600–607, 2010.
- DI SALVO, L. P.; CELLUCCI, G. C.; CARLINO, M. E.; DE SALAMONE, I. E. G. Plant growthpromoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. **Appl. Soil Ecol.** 126, 113–120, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.02.010>.
- DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, A. O.; BERGER, A.; SATORRE, E. H. Fieldevaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. In: Cassán, F. D., Okon, Y., Creus, C.M. (Eds.), **Handbook for Azospirillum**. Springer InternationalPublishing, Cham, pp. 435–445, 2015.

- DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **Eur. J. Soil Biol.** 45, 3–11, 2009.
- DIET, W. H. O. nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. **WHO Technical report series**, 916, 34-8, 2003.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soil**, (36):284–297, 2002.
- DORAN, J. W., COLEMAN, D. C., BEZDICEK, D. F., STEWART, B. A., DORAN, J. W., & PARKIN, T. B. Defining and Assessing Soil Quality. **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**. 1994. doi:10.2136/sssaspecpub35.c1
- DUARTE, A. P.; CECCON, G. Sistemas de produção de milho safrinha na região Sul-Sudeste do Brasil no biênio 2018 e 2019. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 15., 2019, Jataí, GO. **Desafios no cultivo do milho safrinha**: livro de palestras. Sete lagoas, MG: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2019. p. 217-240.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3- acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek** 106:85–125, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S.; JABBOROVA, D.; RÄSÄNEN, L. A.; LIAO, H. Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture. **J Plant Interact** 12:100–107, 2017. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1294212>

- EISSENSTAT, D. M. On the relationship between specific root length and the rate of root proliferation: a field study using citrus rootstocks. **New Phytol** 118:63–68, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00565.x>
- FAO. **How to feed the world in 2050**. Rome: FAO, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/fleadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf>. Acesso em Julho de 2020
- FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, 45(3), 328, 2018. doi:10.1071/fp17167
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, 6(1), 2016.
- GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, 156(3), 609–643, 2010.
- GANESHAN, G.; KUMAR, A. M. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, **Journal of Plant Interactions**, 1:3, 123-134, 2005.
- GARCÍA-FRAILE, P.; CARRO, L.; ROBLEDO, M.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; FLORES-FÉLIX, J. D.; FERNÁNDEZ, M. T.; MATEOS, P. F.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; ÁLVARO PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **PLoS One** 7(5), e38122, 2012.
- GARNIER, E.; LAURENT, G. Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. **New Phytologist**, v. 128, n. 4, p. 725-736, 1994.

GEWIN, V. An underground revolution. **Nature** 466:552–553, 2010.

GODFRAY, H.C.J.; BEDDINGTON, J.R.; CRUTE, I.R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J.F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S.M.; TOULMIN, C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science**, 327, 812–818, 2010.

GOWER, S. T. Relations between mineral nutrient availability and fine root biomass in two Costa Rican tropical wet forests: a hypothesis. **Biotropica** 19:171–175, 1987.

GREEN, V. S.; STOTT, D. E.; CRUZ, J. C.; CURI, N. Tillage impacts on soil biological activity and aggregation in a Brazilian cerrado oxisol. **Soil Till. Res.**, 92, 114-121, 2007.

GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; SILVA, A. S. L.; KLEIN, D. K. Eficiência de inoculante contendo *Bacillus megaterium* (B119) e *Bacillus subtilis* (B2084) para a cultura do milho, associado à fertilização fosfatada. **Research, Society and Development**, 10(12), 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20920>

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2015.

HAHN, L.; DE SÁ, E. L. S.; DA SILVA, W. R.; MACHADO, R. G. Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, v. 19, ns.1/2, p. 33-40, 2013.

HALL, P. G.; KRIEG N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.433-435, 1984.

HAYAT R.; AHMED I.; SHEIRDIL R. A. An Overview of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. In: Ashraf M., Öztürk M., Ahmad

- M., Aksoy A. (eds) **Crop Production for Agricultural Improvement**. Springer, Dordrecht. 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4_22
- HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytol** 162:9–24, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x>
- HOLDAWAY, R. J.; RICHARDSON, S. J.; DICKIE, I. A.; PELTZER, D. A.; COOMES, D. A. Species- and community-level patterns in fine root traits along a 120 000-year soil chronosequence in temperate rain forest. **J Ecol** 99:954–963, 2011.
- HUMANN, J.; KAHN, M. Genes involved in desiccation resistance of rhizobia and other bacteria. In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc, p. 297–404, 2015.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUITIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*phaseolus vulgaris* L.) Rhizobia from Brazil. **Soil Biol Biochem** 21:1515–1528, 2000. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00063-8)
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and soil**, 331(1-2), 413-425, 2010.
- HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (eds) Nitrogen fixation agriculture, forestry, ecology and the environment. **Springer**, Dordrecht, pp 224–253, 2005.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: De Bruijn FJ (ed) **Biological nitrogen fixation**. Hoboken, New Jersey, pp 1009–1023, 2015.

- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol Fertil Soils** 49, 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>
- 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 and Environment**, (221):125-131, 2016.
- HUNGRIA, M.; RONDINA, A. B. L.; NUNES, A. L. P.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, 463(1), 171-186, 2021.
- JOFRÉ, E.; PRÍNCIPE, A.; CASTRO, M.; FISCHER, S.; LAGARES, A.; MORI, G. Molecular aspects of the polysaccharide production in *Azospirillum brasilense* and its role in the establishment of the *Azospirillum*-plant association. In: CASSÁN, F. D.; SALOMONE, I. 36 G. (Eds.). ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, p.113–129, 2008.
- KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; SPIEGEL, H. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralization and enzyme activities of a chernozem under different tillage management. **Biol. Fert. Soils**, 28:343-351, 1999.
- KARAM, D.; BORGHI, E.; MAGALHAES, P.; PAES, M.; PEREIRA FILHO, I. A.; MANTOVANI, E.; SOUZA, T. C.; ADEGAS, F. **Antecipe**: cultivo intercalar antecipado. Brasília – DF: Embrapa (*INFOTECA-E*). 2020. 120p.
- KARAM, D.; PEREIRA FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C.; PAES, M. C. D.; SILVA, J. A. A.; GAMA, J. D. C. M. Resposta de plantas de milho à simulação de danos mecânicos. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, 9(2), 201-211, 2010.

- KEDI, B; SEI, J.; QUIQUAMPOIX, H.; STAUNTON, A. Persistence of catalytic activity of fungal phosphatases incubated in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**. 56:69-74, 2012.
- KRAMER-WALTER, K. R.; BELLINGHAM, P. J.; MILLAR, T. R.; SMISSEN, R. D.; RICHARDSON, S.J.; LAUGHLIN, D. C. Root traits are multidimensional: specific root length is independent from root tissue density and the plant economic spectrum. **J Ecol** 104:1299–1310, 2016.
- 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** 35(4):1074-1087, 2016.
- KOUCHEBAGH, S. B.; MIRSHEKARI, B.; FARAHVASH, F. Improvement of corn yield by seed biofertilization and urea application. **World Appl Sci J**. 16:1239–42, 2012.
- KUMAR, D.; JHARIYA, N. A. Nutritional, medicinal and economical importance of corn: A mini review. **Research Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2, 7–8, 2013.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. **Soil Biol Biochem** 83:184–199, 2015.
- LAMBAIS, M. R.; CURY, J. D. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. D. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em ciência do solo**, 4, 42-84, 2005.
- LI, L.; MA, J.; IBEKWE, A. M.; WANG, Q.; YANG, C. H. Influence of *Bacillus subtilis* B068150 on cucumber rhizosphere microbial composition as a plant protective agent. **Plant Soil**. 429, 519–531, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3709-3>.
- LI, X.; LUO, L.; YANG, J.; LI, B.; YUAN, H. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by

- an efficient and salinity-tolerant aspergillus niger strain An2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, United States, v. 175, n. 5, p. 2755-2768, 2015.
- LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODE'S, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **J Appl Microbiol**, 97:504–511, 2004.
- LONG, H. H.; SCHMIDT, D. D.; BALDWIN, I. T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLoS One** 3:e2702, 2008.
- LYU, Y.; TANG, H.; LI, H.; ZHANG, F.; RENGEL, Z.; WHALLEY, W. R.; SHEN, J. Major crop species show differential balance between root morphological and physiological responses to variable phosphorus supply. **Frontiers of Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1939-1939, 2016.
- MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, 3(1), 21, 2013.
- MARKS, B. B.; MEGIAS, 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**, 5(1), 1-11, 2015.
- MARQUES, A. C. R.; OLIVEIRA, L. B.; NICOLOSO, F. T.; JACQUES, J. S.; GIACOMINI, S. J.; QUADROS, F. L. F. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, 113:54–62, 2017.
- MARTINEZ, V. A.; CRUZ, L.; RAMÍREZ, D. S.; ALEGRÍA, V. A. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. **Applied Soil Ecology** 35:35-45, 2007.

- MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, 11(5), 789–797, 2011.
- MAHESHWARI, D. K.; DHEEMAN, S.; AGARWAL, M. Phytohormoneproducing PGPR for sustainable agriculture. In: Maheshwari, D. K. (ed) **Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem**. Springer, Cham, pp 159–182, 2015.
- MARTHUR, J. W.; MCCORD, G. C. Fertilizing growth: agricultural inputs and their effects in economic development. **J Dev Econ** 127:133–152, 2017.
- MEHNAZ S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: Arora NK editor. **Plant microbes symbiosis: Applied facets**, 2015.
- MENDES, G. O.; DE FREITAS, A. L. M.; PEREIRA, O. L.; DA SILVA, I. R.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, Germany, v. 64, n. 1, p. 239-249, 2014.
- MENDES, I. C.; SOUSA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. C.; SOUZA, L. M. Bioanálise de solo: Aspectos teóricos e práticos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. X, p. 399-462, 2019
- MIRANDA, R. A. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, 2018.
- MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.
- MUMBACH, G. L.; KOTOWSKI, I. E.; SCHNEIDER, F. J. A.; MALLMANN, M. S.; BONFADA, E. B.; PORTELA, V. O.; BONFADA, E. B.; KAISER, D.

- R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e milho safrinha. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2018.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, 27, 31-36, 1962.
- NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bünemann E, Oberson A, Frossard E (ed) **Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling**. Springer-Verlag, Berlin, pp 215–243, 2011.
- NEILL, C.; GIGNOUX, J. Soil organic matter decomposition driven by microbial growth: A simple model for a complex network of interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, 38(4), 803–811, 2006.
- NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **J Plant Nutr** 37:432–446, 2014. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.864308>
- NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, 26(6):872-879, 2003.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.; LAGE, M.; LAGE, P. Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. In: De Bruijn FJ (ed) Biological nitrogen fixation, vol 2. Wiley, Hoboken, pp 925–936, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch90>
- OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

- OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; COTA, L. V.; SANTOS, F. C. dos; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; OLIVEIRA, M. C.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C.; RIBEIRO, V. P.; VASCO JUNIOR, R. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. 18 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 260).
- OLIVEIRA, I. J.; FONTES, J. R. A.; PEREIRA, B. F. F.; MUNIZ, A. W. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increases maize yield. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 5:6, 2018.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; MENNA, P.; ALMEIDA, L. G. P.; OLLERO, F. J.; NICOLÁS, M. F.; RODRIGUES, E. P.; NAKATANI, A. S.; BATISTA, J. S. S.; CHUEIRE, L. M. O.; SOUZA, R. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZROMERO, E. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, p. 735, 2012.
- ORTIZ-CASTRO, R.; CAMPOS-GARCÍA, J.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence *Arabidopsis* root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. **J Plant Growth Regul** 39:254–265, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>
- OSORIO FILHO, B. D.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; GIONGO, A.; DE SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, 46(3), 478-485, 2016.
- PAIVA, C.; MARRIEL, I.; GOMES, E.; COTA, L.; DOS SANTOS, F. C.; DE SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; OLIVEIRA, M. C.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C.; RIBEIRO, V. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2020.

- PALMERO, L.; ULLOA, L.; COLINA, O. L. Selection of *Rhizobium* strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, 45(4), 2011.
- PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. Biological indicators of soil health: synthesis. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. (ed.). **Biological Indicators of Soil Health**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 419-435.
- PAULETTI, V., MOTTA, A. C. V. **Manual de adubação e calagem para o estado do Paraná**. 2. Ed. Curitiba: SBCS/NEPAR, 2017. 482 p.
- PAWAR, P. U.; KUMBHAR, C. T.; PATIL, V. S.; KHOT, G. G. Effect of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas fluorescens* on growth, yield and nutrient uptake in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Crop Res** 53:57–62, 2018. <https://doi.org/10.5958/2454-1761.2018.00009.8>
- PEREG, L.; LUZ, E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, n. 399, p. 389, 2016.
- PETKAR, V. V.; DESHMUKH, T. T.; JADHAV, A. N. Effect of dual inoculation of *Bacillus subtilis* and *Bradyrhizobium japonicum* on growth parameters of soybean (*Glycine max* L.). **Int J Curr Microbiol Appl Sci** 7:563–567, 2018. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.062>
- PIGNATELLI, M.; MOYA, A.; TAMAMES, J.; EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. **Environ. Microbiol. Rep.** 1, 191–197, 2009.
- PILEGGI, M.; PILEGGI, S.; OLCANHESKI, L.; DA SILVA, P. A. G.; GONZALEZ, A. M. M.; KOSKINEN, W. C.; BARBER, B.; SADOWSKY, M. J. Isolation of mesotrienedegrading bacteria from aquatic environments in Brazil. **Chemosphere**, 86:1127–32, 2012.

- PIONEER SEMENTES. **Híbridos de Milho**: 30F53VYHR. Disponível em: <<https://www.pioneersementes.com.br/milho/central-de-produtos/produtos/30f53vyhr>>. Acesso em: 31 de agosto de 2021.
- PLANTE, A. F. Soil Biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: Paul EA (ed) **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. Academic Press, Oxford, pp 389–432, 2007.
- PORTES, T. de A.; CARVALHO, S. I. C.; KLUTHCOUSKI, J.; Aspectos fisiológicos das plantas cultivadas e análise de crescimento do Marandu consorciada com cereais. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Integração Lavoura-Pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. Cap. 10, p. 303-329.
- RIBEIRO, V. P.; MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M. DE; LANA, U. G. DE P.; MATTOS, B. B.; PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49S, p. 40-46, 2018.
- RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; DE SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; COELHO, A. M.; MARRIEL, I. E. OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. **Arch Microbiol.** v. 204, p. 143, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02759-3>
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, 91:552–555, 2004.
- RODRÍGUEZ-SALAZAR, J.; SUÁREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ITURRIAGA, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 52–59, 2009.

- RONDINA, A. B. L.; SANZOVO, A. W. S.; GUIMARÃES, G. S.; WENDLING, J. R.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology & Fertility of Soils**, 56(4), 2020.
- ROPER, M. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. **Mol Plant Pathol**; 12:628–37, 2011.
- ROSER, M.; RITCHIE, H. Fertilizers and Pesticides. **Oxford: Our World in Data**. 2017. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/fertilizer-and-pesticides/>>. Acesso em julho de 2020
- SÁ, J. C. M.; LAL, R.; CERRI, C. C.; LORENZ, K.; HUNGRIA, J.; CARVALHO, P. C. C. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. **Environment International**, 98:102–112, 2017.
- SABER, Z.; PIRDASHTI, H.; ESMAEILI, M.; ABBASIAN, A.; HEIDARZADEH, A. Response of wheat growth parameters to co-inoculation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and different levels of inorganic nitrogen and phosphorus. **World Applied Sciences Journal**, 16 (2): 213-219, 2012.
- SAIKIA, S. P.; BORA, D.; GOSWAMI, A.; MUDOI, K. D.; GOGOI, A. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non-leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, Vol. 6(6), pp. 1085-1102, 2012.
- SANDINI, I. E.; PACENTCHUK, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; DA CRUZ, S. P.; NAKATANI, A. S.; ARAUJO, R. S. Seed inoculation with *Pseudomonas fluorescens* promotes growth, yield and reduces nitrogen application in maize. **International Journal of Agriculture and Biology**, 22(6), 1369-1375, 2019.

- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB express**. 9:205, 2019.
- SCALES, B. S.; DICKSON, R. P.; LIPUMA, J. J.; HUFFNAGLE, G. B. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 927–948, 2014.
- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.
- SILVA, E. J. C.; DALCHIAVON, F. C. Induced defoliation and corn productivity performance. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 4, p. 128-137, 2020.
- SILVEIRA, A. O. Atividade enzimática como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 94 p. 2007.
- SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANRAJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 9(16), pp. 1265-1277, 2014.
- SMITH, S.; HABIB, A.; KANG, Y.; LEGGET, M.; DÍAZ-ZORITA, M. LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. In: de Bruijn, F. (ed) **Biological nitrogen fixation**, v.2, chapter 107. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 1077–1086, 2015.
- SON, H. J.; PARK, G. T.; CHA, M. S.; HEO, M. S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresour Technol**, 97:204–210, 2006.

- SOUSA, S. M.; OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G.; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 1, p. 1-11, 2020.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin Signaling in *Azospirillum brasilense*: A Proteome Analysis. **Biological Nitrogen Fixation**, 937–940, 2015.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487–506, 2000.
- SUBRAMANIAN, P.; KIM, K.; KRISHNAMOORTHY, R.; SUNDARAM, S.; SA, T. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regul** 76:327–332, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9993-x>
- TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: **METHODS of soil analysis: part 2: microbiological and biochemical properties**. Madison: SSSA. p. 775-833, 1994.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase activity of soils. **Soil Science Society of America Proceedings**. v. 34. p.225-229, 1970.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 301–307, 1969.
- TENNANT, D. A. Test of modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, v. 63, p. 995–1001, 1975.
- TUGAROVA, A. V; VETCHINKINA, E. P.; LOSHCHININA, E. A; BUROV, A. M.; NIKITINA, V. E.; KAMNEV, A. A. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 495–503, 2014.

- TURAN, M.; GULLUCE, M.; VON WIRÉN, N.; SAHIN, F. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. **J Plant Nutr Soil Sci**, 175:818–826, 2012.
- VELLOSO, C. C. V.; OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; CARVALHO, C. G.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M.; SOUSA, S. M. Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 9, f1aa157, 2020.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IBP Handbook n° 15)
- WAHYUDI, A. T.; ASTUTI, R. P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A. A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiology Indonesia**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.
- WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiology Reviews**, Vol. 39, No. 6, 2015.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, 52(suppl_1), 487–511, 2001.
- WHITE, P. J. Root traits benefitting crop production in environments with limited water and nutrient availability. **Ann Bot** 124:883–890, 2019. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz162>
- WILLIS, R. B.; MONTGOMERY, M. E.; ALLEN, P. R. Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. **J Agric Food Chem**, 44:1804–1807, 1996. <https://doi.org/10.1021/jf950522b>
- 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** 62 (3):279-285, 2016.

YORK, L. M.; NORD, E. A.; LYNCH, J. P. Integration of root phenes for soil resource acquisition. **Front Plant Sci** 4:355, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00355>