



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EDUARDO HÉLDER HORÁCIO

**COINOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *Azospirillum  
brasilense* e *Rhizobium*, ASSOCIADAS A DOSES DE  
NITROGÊNIO EM COBERTURA NO DESENVOLVIMENTO E  
DESEMPENHO PRODUTIVO DE MILHO E FEIJÃO COMUM.**

EDUARDO HÉLDER HORÁCIO

**COINOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *Azospirillum  
brasilense* e *Rhizobium*, ASSOCIADAS A DOSES DE  
NITROGÊNIO EM COBERTURA NO DESENVOLVIMENTO E  
DESEMPENHO PRODUTIVO DE MILHO E FEIJÃO COMUM.**

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

Orientador: Prof. Dr. Claudemir Zucareli

Co-Orientadora: Dra. Diva Souza Andrade

Londrina  
2021

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

**HORÁCIO, EDUARDO HÉLDER.**

Coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium*, associadas a doses de nitrogênio em cobertura no desenvolvimento e desempenho produtivo de milho e feijão comum / EDUARDO HÉLDER HORÁCIO. - Londrina, 2021.  
128 f.

Orientador: CLAUDEMIR ZUCARELI.

Coorientador: DIVA DE SOUSA ANDRADE.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. COINOCULAÇÃO - Tese. 2. CIANOBACTÉRIAS - Tese. 3. AZOSPIRILLUM - Tese. 4. RHIZOBIUM - Tese. I. ZUCARELI, CLAUDEMIR . II. ANDRADE, DIVA DE SOUSA. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

EDUARDO HÉLDER HORÁCIO

**COINOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *Azospirillum  
brasilense* e *Rhizobium*, ASSOCIADAS A DOSES DE  
NITROGÊNIO EM COBERTURA NO DESENVOLVIMENTO E  
DESEMPENHO PRODUTIVO DE MILHO E FEIJÃO COMUM.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Claudemir Zucareli  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.Doutor André Mateus Prando  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
– Embrapa

---

Prof. Dr. Freddy Eli Zambrano  
Universidad Técnica de Manabi – UTM

---

Prof. Dr. Higo Forlan Amaral  
Centro Universitário Filadélfia – UniFil

---

Profa. Dra. Nídia Raquel Costa  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” - Botucatu – UNESP

Londrina, 26 de fevereiro de 2021

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Eduardo Hélder Horácio** - nasceu em 03 de fevereiro de 1986 em Cuamba- Niassa, Moçambique. Em 2005 ingressou no curso de Ciências Agrárias na Universidade Católica de Moçambique, Faculdade de Agricultura de Cuamba-Niassa, na qual em 2009 obteve o título de Engenheiro Agrônomo. Em março de 2013 iniciou o curso de Pós-graduação *strictu-senso* em nível de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal na Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás – UFG, atualmente Universidade Federal de Jataí, estado de Goiás, Brasil. Frequentou o curso de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em Londrina-PR, Brasil.

“Talvez eu não consegui fazer o melhor, mas lutei pelo melhor a ser feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes”.

**Marthin Luther King Jr.**

Aos meus pais Horácio Rodriguês Manuel e Laura Suzana Penete, pelo amor, apoio e incentivo nos estudos, e por todos os ensinamentos a mim passados no decorrer de toda minha vida.

**DEDICO E OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, iluminando meus passos e me protegendo nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Aurélia da Conceição, Felizarda Deolinda, Manuela Flávia, Ivete Suzana e Inocência Collor de Melo, aos meus sobrinhos e todos familiares pela união e amor em todas as ações e conquistas realizadas, mesmo perante as dificuldades.

Agradeço em especial à minha esposa Nélia Bernardo Lancheque, aos meus filhos Felizarda da Nelva e Eduardo Hélder Júnior pela confiança, paciência e companheirismo ao longo da minha vida acadêmica mesmo que distantes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudemir Zucareli e a co-orientadora Dra. Diva Souza Andrade pela orientação, paciência, amizade, e apoio durante todos esses anos, no decorrer do doutorado, e que assim se conserve. Obrigado por toda a dedicação que têm para com seus orientados e por fazerem toda a diferença em minha formação pessoal e profissional. Herdar seus ensinamentos e amizade foram um dos principais ganhos que obtive.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Freddy Zambrano Gavilanes, Prof. Dr. Higo Forlan Amaral, Profa. Dra. Nídia Raquel Costa, Dr. Mateus Prando, pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas de pesquisa Dr. Thiago Montagner Souza, Bruna Silva e Poliana Catarina pela dedicação e ajuda nesta pesquisa.

Ao Governo da República de Moçambique pela parceria com a República Federativa do Brasil no âmbito da cooperação na área técnico-científica, à Universidade Rovuma-Nampula, pela autorização na continuação dos estudos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade. Aos funcionários e técnicos administrativos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela ajuda e ensinamentos na condução da pesquisa.

Aos colegas e professores do Programa de pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos, pelo convívio, dividindo dificuldades, experiências e momentos de descontração.

**A todos, muito obrigado.**

HORÁCIO, Eduardo Hélder. **Coinoculação de cianobactérias com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium*, associadas a doses de nitrogênio em cobertura no desenvolvimento e desempenho produtivo de milho (*Zea mays* L.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** 128 f. Tese de Doutorado em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina-UEL, Londrina, 2021.

## RESUMO

As cianobactérias são fixadoras de nitrogênio (N) atmosférico e consideradas promotoras de crescimento vegetal. A sua associação ou não com outras bactérias, com funções semelhantes ou diferentes nas culturas do milho (*Zea mays* L.) e do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), na tentativa de reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados, melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas e incrementar a produtividade de grãos são uma boa alternativa para uma agricultura sustentável. Porém, vários fatores podem interferir na obtenção destes benefícios às culturas como a cultivar utilizada, condições edafoclimáticas e o manejo adotado durante os cultivos. Assim, objetivou-se avaliar o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho e feijão comum sob coinoculação de cianobactérias das espécies *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevissima* com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium*, associadas a doses de N em cobertura, em dois experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito da coinoculação de *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima* e *Azospirillum brasilense* associada a quatro doses de N em cobertura, sobre o crescimento e produtividade do milho. O experimento foi realizado em duas safras, e em cada experimento, utilizou-se o delineamento de parcelas subdivididas em arranjo fatorial 8x4, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas pelos tratamentos: (i) não inoculado, (ii) inoculação de *Azospirillum brasilense* (Azo), (iii) de *Anabaena cylindrica* (Ana), (iv) de *Calothrix brevissima* (Cal), (v) coinoculação de Azo + Ana, (vi) de Azo + Cal, (vii) de Ana + Cal e (viii) de Azo + Ana + Cal. As subparcelas foram constituídas por quatro doses de N em cobertura (0, 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>), em que se utilizou a ureia. Avaliaram-se as variáveis relacionadas ao crescimento e desempenho produtivo, no qual se concluiu que a coinoculação de *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* + 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura favoreceu o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho, com incrementos de 1647; 2284 e 1625 kg de grãos ha<sup>-1</sup>, respectivamente, quando comparado ao tratamento não adubado e não inoculado, na safra de 2017/2018. Na safra de 2018/2019 não foram observados ganhos de produtividade de grãos do milho devido à inoculação com os microrganismos associados às doses de N em cobertura. No segundo experimento, objetivou-se avaliar a coinoculação de *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima* e *Rhizobium* (*R. tropici* + *R. freire*) associada a duas doses de N em cobertura no crescimento e produtividade do feijoeiro. O experimento foi realizado nas 1ª. e 2ª. épocas de semeadura de feijão, utilizando-se o delineamento de parcelas subdivididas em esquema fatorial (12 x 2 + 1), com quatro repetições. As parcelas foram constituídas por: (i) N-mineral, (ii) inoculação de rizóbio (*Rhizobium tropici* + *Rhizobium freire*) (Riz), (iii) de *Azospirillum brasilense* (Azo), (iv) *Anabaena cylindrica* (Ana), (v) *Calothrix brevissima* (Cal) e (vi) coinoculação de Riz + Azo, (vii) Riz + Cal, (viii) Riz + Ana, (ix) de Azo + Cal, (x) Azo + Ana, (xi) de Riz + Azo + Cal, e (xii) de Riz + Azo + Ana. As subparcelas foram constituídas por duas doses de N em cobertura (30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>) com 30 kg N ha<sup>-1</sup> na base, além do tratamento controle. Avaliaram-

se as variáveis relacionadas ao crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro, no qual se concluiu que a coinoculação de rizóbio com *A. brasilense* e cianobactérias, assim como a aplicação do adubo nitrogenado em cobertura mostrou-se favorável à produção de grãos do feijão comum quando comparada ao tratamento controle. O maior destaque foi a primeira época de semeadura do feijão comum que demonstrou ganhos acima de 700 kg, sendo 1085 kg ha<sup>-1</sup> de grãos na coinoculação de *Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup>*, 993 e 788 kg ha<sup>-1</sup> no tratamento *Riz + Azo + Ana + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>* e 839 kg ha<sup>-1</sup> de grãos no *Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup>*. Na segunda época, em comparação ao tratamento controle, houve ganhos na coinoculação de *Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup>* (688 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), de *Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup>* (507 kg ha<sup>-1</sup> de grãos) e de *Azo + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup>* com 456 kg ha<sup>-1</sup> de grãos. A associação das cianobactérias com *A. brasilense* no milho e com rizóbio no feijoeiro com aplicação de N em cobertura demonstrou ser uma prática agrônômica eficiente para as duas culturas, resultando em incremento no rendimento de grãos comparativamente às plantas não inoculadas e não adubadas.

**Palavras Chave:** *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; bactérias diazotróficas; promoção de crescimento vegetal; Rizobactérias; Adubação nitrogenada.

HORÁCIO, Eduardo Hélder. **Co-inoculation of cyanobacteria with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium* associated with N rates at top dressing in the development and productive performance of corn (*Zea mays* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.).** 128 p. PhD Thesis in Agronomy - State University of Londrina-UEL, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are fixers of atmospheric nitrogen (N) and are considered promoters of plant growth. Its association or not with other bacteria, with similar or different functions in the cultures of corn (*Zea mays* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in an attempt to reduce the use of nitrogen fertilizers, improve the growth and development of plants and increasing grain productivity are a good alternative for sustainable agriculture. However, several factors can interfere in obtaining these benefits to the cultures like the cultivar used, edaphoclimatic conditions, and the management adopted during the cultivations. Thus, the objective was to evaluate the development and productive performance of corn and common beans under co-inoculation of cyanobacteria of the species *Anabaena cylindrica* and *Calothrix brevissima* with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium*, associated with four nitrogen rates at topdressing, in two experiments. The first experiment aimed to evaluate the effect of *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima*, and *Azospirillum brasilense* associated with N rates at topdressing, on corn growth and productivity. The experiment was carried out in two crop seasons, and each experiment has used a design of plots subdivided in an 8x4 factorial scheme, with four replications. The plots consisted of: (i) uninoculated treatment, (ii) inoculation of *Azospirillum brasilense* (Azo), (iii) *Anabaena cylindrica* (Ana), (iv) *Calothrix brevissima* (Cal), (v) co-inoculation of Azo + Ana, (vi) Azo + Cal, (vii) Ana + Cal and (viii) Azo + Ana + Cal. The subplots consisted of four N rates at topdressing (0, 25, 50, and 100 kg ha<sup>-1</sup>), in which urea was used. Variables related to growth and productive performance were evaluated, in which it was concluded that the co-inoculation of *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* + 25, 50 and 100 kg ha<sup>-1</sup> of N favored the development and performance corn production, in increments of 1647; 2284 and 1625 kg of grains ha<sup>-1</sup>, respectively, when compared to unfertilized and uninoculated treatment, in the 2017/2018 crop season. In the 2018/2019 crop season, there were not observed gains in corn grain yield due to inoculation with microorganisms associated with N rates at topdressing. In the second experiment, the objective was to evaluate the co-inoculation of *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima*, and *Rhizobium* (*R. tropici* + *R. freire*) associated with two N rates at topdressing in the growth and productivity of common bean. The experiment was carried out on the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> common bean sowing seasons, using the design of plots subdivided in a factorial scheme (12 x 2 + 1), with four replications. The plots consisted of: (i) N-mineral, (ii) inoculation of rhizobium (*Rhizobium tropici* + *Rhizobium freire*) (Riz), (iii) *Azospirillum brasilense* (Azo), (iv) *Anabaena cylindrica* (Ana), (v) *Calothrix brevissima* (Cal) and (vi) Co-inoculation of Riz + Azo, (vii) Riz + Cal, (viii) Riz + Ana, (ix) of Azo + Cal, (x) Azo + Ana, (xi) of Riz + Azo + Cal, and (xii) of Riz + Azo + Ana. The subplots consisted of two N rates at topdressing (30 and 60 kg N ha<sup>-1</sup>) with 30 kg N ha<sup>-1</sup> at the base, in addition to the control treatment. Variables related to the growth and productive performance of common beans were evaluated, in which it was concluded that the co-inoculation of rhizobia with *A. brasilense* and cyanobacteria, as

well as the application of nitrogen fertilizer in cover, was favorable to the production of common bean grains compared to the control treatment. The biggest highlight was the first sowing time of common beans, which showed gains of over 700 kg ha<sup>-1</sup> of grains, with 1085 kg ha<sup>-1</sup> of grains in the co-inoculation of Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup>, 993 and 788 kg ha<sup>-1</sup> of grains in in the treatment Riz + Azo + Ana + 30 and 60 kg N ha<sup>-1</sup> and 839 kg ha<sup>-1</sup> of grains kg ha<sup>-1</sup> of grains in Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup>. In the second sowing season, compared to the control treatment, there were gains in the co-inoculation of Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (688 kg of grains ha<sup>-1</sup>), Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (507 kg ha<sup>-1</sup> of grains) and Azo + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> with 456 kg ha<sup>-1</sup> of grains. The association of cyanobacteria with *A. brasilense* in maize and with rhizobia in the common bean with application of N at topdressing proved to be an efficient agronomic practice for these crops, resulting in an increase in grain yield compared to uninoculated and unfertilized plants.

**Key words:** *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; diazotrophic bacteria; promoting plant growth; Rhizobacteria; Nitrogen fertilization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fases de desenvolvimento da cultura do milho (WEISMANN, 2008) .....	27
<b>Figura 2</b> – Fases de desenvolvimento da cultura do feijão comum .....	34
<b>Figura 3</b> – Cianobactéria <i>Anabaena cylindrica</i> .....	40
<b>Figura 4</b> – Cianobactéria <i>Calothrix brevissima</i> .....	41
<b>Figura 5</b> – Precipitação pluvial e temperaturas máxima e mínima (T máx e T mín) referente aos períodos experimentais (A) Safra 1 (11/2017 a 05/2018) e (B) Safra 2 (11/2018 a 04/2019), Londrina-PR.....	71
<b>Figura 6</b> – Efeito da interação significativa entre Safra (S) e doses de N em cobertura (N) para o teor de N foliar na cultura do milho em função da inoculação ou coinoculação de <i>A. brasilense</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C. brevíssima</i> , com quatro doses de nitrogênio em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019 .....	82
<b>Figura 7</b> – Efeito da interação significativa Safra (S) e doses de N em cobertura (N) para a produtividade do milho inoculado com <i>A. brasilense</i> , <i>A. cylindrica</i> e <i>C. brevíssima</i> , com quatro doses de nitrogênio em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019 .....	83
<b>Figura 8</b> – Precipitação pluvial e temperaturas máxima e mínima (T máx e T mín) referente aos períodos experimentais de (A) 2ª. época de semadura (28/03 a 06/06/2019) e (B) 1ª. época de semeadura do feijão comum (16/09/2019 a 15/12/2019), Londrina-PR.....	100

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características químicas do solo das áreas experimentais, antes da implantação da cultura, na camada de 0 a 20 cm. Londrina, PR, Safras de 2017/2018 e 2018/2019 .....71
- Tabela 2** – Valores médios e análise de variância (*p*) para altura de plantas (AP), altura de inserção de espigas (AIE), diâmetro do colmo (DC), área foliar (AF), nitrogênio, fósforo e potássio foliar (N, P, e K) do milho inoculado e coinoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura em 2017/2018 e 2018/2019. Londrina .....77
- Tabela 3** – Valores médios e análise de variância (*p*) de prolificidade (PROL), número de grãos por espiga (GE), massa de mil grãos (MMG), produtividade de grãos (PG) e proteína bruta (PB) do milho inoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura em 2017/2018 e 2018/2019. Londrina PR .....78
- Tabela 4** – Efeito da interação significativa entre ano (A) e inoculação (I) para teor de fósforo e produtividade do milho inoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de N em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019 .....84
- Tabela 5** – Efeito da interação significativa entre Inoculação (I) e doses de nitrogênio em cobertura (N) para proteína bruta do milho, para as duas safras de cultivo de cultivo de milho .....85
- Tabela 6** – Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de N-cobertura, em relação ao tratamento testemunha, na safra de 2017/2018, Londrina-PR .....86
- Tabela 7** – Incremento de produtividade em kg ha<sup>-1</sup> e em porcentagem do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento sem inoculação e adubado com 100 kg ha<sup>-1</sup> de N-cobertura, na safra de 2017/2018, Londrina-PR .....87

<b>Tabela 8</b> – Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e <i>A. brasilense</i> associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento controle, safra de 2018/2019, Londrina-PR .....	87
<b>Tabela 9</b> – Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e <i>A. brasilense</i> associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento adubado com 100 kg ha <sup>-1</sup> de N em cobertura, na safra de 2018/2019, Londrina,PR .....	88
<b>Tabela 10</b> – Características químicas do solo da área experimental, antes da instalação dos experimentos, na camada de 0 a 20 cm, na 1 <sup>a</sup> . e 2 <sup>a</sup> . época de semeadura do feijão, 2019, Londrina, PR .....	100
<b>Tabela 11</b> – Valores médios e análise de variância ( <i>p</i> ) conjunta da 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> época de semeadura do feijoeiro, 2019. Altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), matéria seca total (MST), matéria seca foliar (MSF) e de teor de nitrogênio foliar (TN) do feijão comum inoculado e coinoculado com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>C. brevíssima</i> e <i>A. cylindrica</i> , associadas a duas doses de N em cobertura. Interação do nitrogênio em cobertura (N), inoculação (I) e época (E), Londrina-PR .....	106
<b>Tabela 12</b> – Valores médios e análise de variância ( <i>p</i> ) conjunta da 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> época de semeadura do feijoeiro, 2019. Número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) do feijão comum inoculado e coinoculado com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>C. brevíssima</i> e <i>A. cylindrica</i> , associadas a duas doses de N em cobertura. Interação do nitrogênio em cobertura (N), inoculação (I) e época (E), Londrina-PR .....	107
<b>Tabela 13</b> – Valores médios de matéria seca total (MST) e matéria seca foliar (MSF) do feijão comum inoculado e coinoculado com <i>R. tropici</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>C. brevíssima</i> e <i>A. cylindrica</i> , associadas a duas doses de N em cobertura. Interação de inoculação, épocas de semeadura e doses de N em cobertura (N), Londrina-PR .....	109

<b>Tabela 14</b> – Valores médios de teor de N foliar (TN) do feijão inoculado e coinoculado com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>C. brevíssima</i> e <i>A. cylindrica</i> , associadas a duas doses de N em cobertura. Interação entre doses de N em cobertura (N) e inoculação (I) de microrganismos.....	110
<b>Tabela 15</b> – Valores médios de número grãos por vagem (NGV) do feijão comum inoculado e coinoculado com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>C. brevíssima</i> e <i>A. cylindrica</i> , associadas a duas doses de N em cobertura. Interação entre épocas de semeadura (E) e Inoculação (I) de microrganismos .....	111
<b>Tabela 16</b> – Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação), para altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), massa seca total (MST), massa seca foliar (MSF), teor de N foliar (TN), na 2ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019 .....	114
<b>Tabela 17</b> – Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para número de vagem por planta (NVP), número de grão por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) na 2ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019 .....	115
<b>Tabela 18</b> – Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), massa seca total (MST), massa seca foliar (MSF), teor de N foliar (TN), na 1ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019 .....	116

<b>Tabela 19</b> – Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para número de vagem por planta (NVP), número de grão por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) na 1ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019 .....	117
<b>Tabela 20</b> – Incremento de produtividade do feijão comum inoculado e coinoculado com <i>Rhizobium</i> , <i>A. brasilense</i> e Cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em relação ao tratamento controle, em duas épocas de semeadura, Londrina-PR, 2019 .....	118

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
2.1	A CULTURA DO MILHO .....	24
2.1.1	Fenologia Do Milho.....	26
2.1.2	Nitrogênio Na Cultura Do Milho .....	28
2.1.3	Doses De Nitrogênio Na Cultura Do Milho .....	30
2.2	A CULTURA DO FEIJOEIRO: IMPORTÂNCIA E PRODUÇÃO .....	31
2.2.2	Características E Fenologia Do Feijão Comum.....	33
2.2.3	Importância Do Nitrogênio Na Cultura Do Feijoeiro.....	34
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ASSOCIATIVA E DE DE VIDA LIVRE .....	36
2.3.1	Cianobactérias.....	37
2.3.1.1	<i>Anabaena cylindrica</i> .....	39
2.3.1.2	<i>Calothrix brevíssima</i> .....	41
2.3.2	Rizóbios.....	42
2.3.3	Bactérias Diazotróficas Associativas .....	43
2.3.3.1	Gênero azospirillum.....	44
2.4	COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIATIVAS E DE VIDA LIVRE.....	46
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1. COINOCULAÇÃO DE ANABAENA CYLINDRICA, CALOTHRIX BREVISSIMA E AZOSPIRILLUM BRASILENSE ASSOCIADA A DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE MILHO (ZEA MAYS L.)</b> .....	<b>67</b>
3.1	RESUMO .....	67
3.2	ABSTRACT .....	67
3.3	INTRODUÇÃO .....	69
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.4.1	Caracterização Da Área Experimental .....	71
3.4.2	Delineamento Experimental E Tratamentos .....	72
3.4.3	Manejo Da Cultura Do Milho.....	73

3.4.4	Avaliações Fitométricas, Componentes De Produção E Produtividade De Grãos Na Cultura Do Milho .....	74
3.4.5	Análises Nutricionais .....	75
3.4.6	Análise Estatística .....	76
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.6	CONCLUSÕES .....	90
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2. COINOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS, RIZÓBIO E AZOSPIRILLUM BRASILENSE ASSOCIADA A DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA NA PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO COMUM (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>, L.) .....</b>	<b>96</b>
4.1	RESUMO .....	96
4.2	ABSTRACT .....	96
4.3	INTRODUÇÃO .....	98
4.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	100
4.4.1	Caracterização Da Área Experimental .....	100
4.4.2	Delineamento Experimental E Tratamentos .....	101
4.4.3	Implantação E Condução Da Cultura Do Feijoeiro .....	102
4.4.4	Avaliações .....	103
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>105</b>
5.1	CONCLUSÃO .....	122
5.2	CONCLUSÕES GERAIS .....	123
5.3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	124

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) estão entre as culturas de maior importância mundial e sua produção faz parte de um dos princípios para a garantia da segurança alimentar. Devido a importância destas culturas, há a crescente demanda na sua produção, tanto em quantidade como em qualidade.

Os sistemas de produção das duas culturas no Brasil são diversos, desde a agricultura familiar responsáveis pela produção de cerca de 70% dos alimentos consumidos no país, sem utilização de grandes maquinários, nem mesmo grandes insumos de produção condicionando assim, baixa produtividade das culturas.

Por outro lado, observam-se lavouras que utilizam o mais alto nível tecnológico, alcançando produtividades equivalentes aos líderes agrícolas mundiais, e com grandes possibilidades de expansão nos próximos anos.

Estas culturas são consideradas muito exigentes nutricionalmente, principalmente com relação ao nitrogênio que normalmente é requerido em maior quantidade, dentre os demais nutrientes. Assim, entre os desafios para o fornecimento de nitrogênio, destacam-se seu elevado custo e dificuldade de manejo, com baixa eficiência de aproveitamento e perdas por lixiviação e volatilização, causando danos ambientais e aumento do custo de produção das culturas.

Com a crescente busca pela sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma alternativa que tem sido empregue principalmente no âmbito da economia de fertilizantes nitrogenados, a qual pode suplementar ou até mesmo substituir os fertilizantes sintéticos.

Neste contexto, a utilização de microrganismos diazotróficos e promotores de crescimento de plantas representam uma importante estratégia ambiental e biotecnológica, ecologicamente e economicamente sustentáveis para o setor agrícola.

As cianobactérias tem um potencial se serem utilizadas como biofertilizantes e representam uma importante estratégia agroecológica, respeitando o equilíbrio dinâmico ambiental sem perda na produtividade agrícola, sendo microrganismos benéficos para a fertilidade do solo. Devido a sua capacidade de fixarem o nitrogênio atmosférico, auxiliam na agregação das partículas do solo produzindo metabólitos, e com isso permitem a manutenção da umidade do solo, reduzindo os riscos de

erosão, além de proporcionar melhores condições edáficas ao desenvolvimento das culturas.

As cianobactérias atuam ainda na melhor ativação da fotossíntese, melhoram a capacidade de absorção de nutrientes, atuam na floração, diminuindo o número de abortos florais, produzem diferentes reguladores de crescimento como auxinas, citocininas, giberelinas e betaínas, fornecendo macronutrientes como Ca, K e P, e os micronutrientes Fe, Cu, Zn, B, Mn, Co e Mo, às plantas.

Nos sistemas de produção atuais, a prática mais conhecida e consolidada de utilização das cianobactérias é a inoculação na cultura do arroz. Os resultados encontrados na literatura apresentam maior eficiência na fixação biológica de N.

Em relação ao gênero *Azospirillum*, designadas por bactérias diazotróficas associativas, são capazes de associar-se com espécies vegetais e são encontrados principalmente na rizosfera de gramíneas, podendo também ocorrer na parte aérea. Bactérias do gênero *Azospirillum* também realizam a FBN e produzem substâncias que auxiliam no crescimento radicular, aumento da colonização micorrízica, e aumento na eficiência de absorção de nutrientes, conseqüentemente contribuem no aumento da produtividade das culturas.

Bactérias associativas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada e posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de N para as plantas. Contudo, é importante salientar que o processo de FBN por estas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas.

No Brasil, atualmente, o inoculante comercial mais produzido e utilizado para as culturas de gramíneas como milho, trigo, cana de açúcar, arroz e mais recentemente brachiaria é o que utiliza bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5 e AbV6, adaptadas aos solos tropicais, que podem fixar até 50% do N que a planta necessita.

Por último, os rizóbios, são denominadas bactérias fixadoras de N que nodulam leguminosas. Estas bactérias caracterizam-se como as mais eficientes decorrente de uma parceria vegetal e microrganismo, considerado um processo de simbiose muito evoluído. A simbiose de leguminosas com esse grupo caracteriza-se pela formação de nódulos nas raízes e caules. Plantas que apresentam quantidades significativas de nódulos nas raízes e/ou caule têm suprida toda sua demanda por N.

Para a cultura do feijoeiro no Brasil, as estirpes aprovadas para a inoculação pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), do são *Rhizobium tropici* estirpe SEMIA 4077 (=CIAT899), *R. freirei* SEMIA 4080 (=PRF 81) e *R. tropici* SEMIA 4088 (=H12). A simbiose entre rizóbios e o feijão pode fixar até 30% do N requerido pela planta, contribuindo com 20 a 40 kg N ha<sup>-1</sup>.

Porém, devido ao ciclo curto da cultura do feijão comum, a resposta tardia da planta ao simbionte, a promiscuidade nodular do feijoeiro e a competição das estirpes bacterianas introduzidas em relação às nativas no solo, podem comprometer a eficiência da FBN.

Pesquisas realizadas com a coinoculação de *A. brasilense* com outras bactérias promotoras de crescimento de plantas verificam-se mais em híbridos em relação às variedades de milho, e observam-se aumentos em produtividade. Para as leguminosas, verifica-se mais a tecnologia de coinoculação de *A. brasilense* com rizóbios, e resultados também apresentam efeitos positivos. Pouco se relata sobre a inoculação mista de cianobactérias com bactérias do gênero *Rhizobium*, assim como sua associação com bactérias do gênero *Azospirillum* para ambas as culturas.

A resposta da inoculação isolada ou combinada pode variar de acordo com o genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a quantidade e qualidade das células dos microrganismos utilizados como inoculante.

Torna-se importante enfatizar que os fatores ambientais possuem grande influência na eficiência do processo interação bactéria-planta. Por outro lado, quanto à interação da inoculação com adubação nitrogenada em plantas, os resultados são variados, sendo que certas pesquisas demonstram eficiência na ausência e outras na presença N em cobertura.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi o de gerar informações técnicas que auxiliem os produtores na adoção de melhores tecnologias na inoculação de espécies de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Calothrix* de forma isolada, assim como associadas as bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Azospirillum* no feijoeiro comum e *Azospirillum* no milho associadas a diferentes doses de N em cobertura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, alógama, pertencente à família *Poaceae*, com centro de origem na América do Norte (SILVEIRA et al., 2015). Devido a sua adaptabilidade em diferentes condições edáficas, a cultura foi expandida e cultivada em todos os continentes, tornando-se assim uma das gramíneas mais cultivadas no mundo (TEIXEIRA et al., 2002; FORNASIERI-FILLHO, 2007).

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

A planta de milho apresenta sistema radicular fasciculado, podendo atingir até 3 m de profundidade, além de ser classificada no grupo das plantas C4, possuindo ampla adaptação à diferentes condições de ambiente. Possui um caule em forma de colmo cheio, que se constitui por nós e entrenós. Ao entrar no período do florescimento, as plantas de milho emitem as inflorescências masculina (pendão) e feminina (espiga), e o seu fruto é classificado botanicamente como tipo cariopse, apresentando três partes, sendo pericarpo, endosperma e embrião (ANDRADE; BRITO, 2006).

O grão de milho é formado por quatro partes: endosperma, gérmen (embrião), pericarpo (casca) e ponta (PAES, 2006). A ponta é a menor estrutura do grão, com função de conexão ao sabugo e é formada por material lignocelulósico (2% do grão). O pericarpo (5%) confere proteção ao ambiente e é formado essencialmente por celulose e hemicelulose. O gérmen é a parte vegetativa do grão onde se encontra o embrião (11%), e é constituído principalmente de lipídeos e proteínas, além de vitamina E, minerais e açúcares (PAES, 2006).

O endosperma constitui 82% do grão de milho e é uma importante região de estocagem de energia onde se concentra 98% do amido, e em menor proporção é constituído de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. O endosperma pode ser classificado como vítreo (córneo) e farináceo (denso) de acordo com a distribuição proteica e dos grãos de amido (GONÇALVES et al., 2009). A diferença marcante entre os dois tipos é a presença de matriz proteica circundando os grânulos de

amido presente no endosperma vítreo, o que não ocorre no endosperma farináceo, no qual os grânulos de amido estão dispersos (PAES, 2006). O milho duro possui o endosperma completamente vítreo, o farináceo, completamente farináceo, e o dentado possui a parte central farinácea e as laterais vítreas.

Os Estados Unidos prevê em seu 1º levantamento para a safra mundial de milho 2020/21, uma produção global recorde de 1.186,9 milhões de toneladas, seguido da China com 260 milhões de toneladas de toneladas. A estimativa de safra brasileira é de 107 milhões de toneladas, sem alterações até junho. A produção na Argentina, Ucrânia e África do Sul devem atingir 50, 39 e 14 milhões de toneladas, respectivamente, sem alterações (USDA, 2021).

A produção brasileira de milho é classificada em três safras. O cultivo da primeira safra é realizado nas regiões Sudeste e Centro-oeste com semeadura entre os meses de outubro e novembro, no Nordeste nos meses de janeiro e fevereiro e na região Sul a partir do fim de agosto. A segunda safra ocorre apenas na região Centro-sul do país, e a semeadura tem sido realizada nos meses de janeiro a abril e envolve os estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná (DUARTE; GARCIA; MIRANDA, 2011).

Para a CONAB (2020) o cultivo da terceira safra se concentra no período que se estende de maio a junho, assemelhado ao que acontece com as lavouras plantadas no hemisfério norte. Estas áreas produtivas estão localizadas nas regiões de Sealba (Sergipe, Alagoas, nordeste da Bahia) e também aquelas nas áreas situadas acima da linha do equador, como em Roraima.

A produção nacional de milho, considerando as três safras na temporada 2010/21, foi de 1.638,3 mil toneladas, com 18.463,5 mil hectares de área cultivada e produtividade média de 5.541 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2021). No estado do Paraná, estado em que foi desenvolvida a pesquisa, para a primeira safra, foram cultivados 2.585,2 mil hectares, com produção de 15.923,9 mil ton e produtividade média de 6.160 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2020).

O cultivo do milho tem crescido muito rapidamente no Brasil, principalmente pelo aumento da demanda do grão e seus derivados no mercado nacional e mundial. Apesar dessa perspectiva positiva, a cadeia produtiva brasileira do milho enfrenta sérios desafios: produtividade média menor que a dos principais concorrentes; tecnologia não difundida, sobretudo nas propriedades menores e com

baixa intensificação de capital; e infraestrutura logística deficiente (COELHO et al., 2004; CALDARELLI; BACCHI, 2012).

No Brasil, dentre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do milho destacam-se o clima, o potencial genético e o manejo de nutrientes e pragas (HOEFT, 2003). Considera-se que a fertilidade do solo seja um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade de áreas destinadas tanto à produção de grãos como de forragem. Este fato não se deve apenas aos baixos teores de nutrientes presentes nos solos, mas, também, ao uso inadequado de adubações, principalmente com N e K.

A produtividade da cultura do milho está mutuamente correlacionada à fertilidade do solo, enfatizando principalmente a disponibilidade de nitrogênio, nutriente este, imensamente restritivo no processo produtivo (BREDA et al., 2016).

Durante o cultivo do milho, as plantas podem aproveitar somente ou menos que 50% do fertilizante nitrogenado aplicado devido às perdas principalmente por volatilização, lixiviação, desnitrificação, entre outros fatores. Portanto, torna-se necessário à realização de estudos de outras tecnologias eficientes na utilização de N, como é o caso da inoculação em sementes de milho com bactérias diazotróficas para a maximização na assimilação e utilização desse nutriente, buscando o cultivo mais sustentável e reduzindo deste modo, a dependência de fertilizantes nitrogenados. Dessa forma, podem-se alcançar boas produtividades e conseqüentemente, reduzir os custos de produção da lavoura e a poluição ambiental (REIS JÚNIOR et al., 2008).

### **2.1.1 Fenologia do milho**

O crescimento e desenvolvimento de uma planta de milho são divididos em dois grandes estádios: o vegetativo (V) e o reprodutivo (R). Os estádios vegetativo e reprodutivo da planta de milho (Figura 1) são: Fase vegetativa (V), a partir da emergência ( $V_E$ ),  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  até  $V_n$ ; em que (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento ( $V_T$ ). Todas as folhas e espigas que a planta eventualmente irá produzir formam-se no estádio  $V_3$ . Neste estádio, ocorre o estabelecimento do número máximo de grãos, ou a definição da produção potencial (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

No estádio  $V_5$ , quando cinco folhas da planta de milho estão completamente

desenvolvidas, tanto a iniciação das folhas como das espigas está completa e a iniciação do pendão já pode ser vista na forma microscópica, na extremidade de formação do caule, logo abaixo da superfície do solo. O estágio  $V_T$  (pendoamento) inicia-se quando o último ramo do pendão está completamente visível. Nesta fase, cada estágio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo. Assim, a primeira folha de cima para baixo, com o colar visível, é considerada completamente desenvolvida, sendo contada como tal (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Na fase reprodutiva (R), tem início com o florescimento ( $R_1$ ), compreendendo a visualização dos estilos - estigmas fora das brácteas. Os estádios posteriores são o de grão leitoso ( $R_2$ ) de 10 a 14 dias após o florescimento, grão pastoso ( $R_3$ ) de 18 a 22 dias após o florescimento, grão farináceo ( $R_4$ ) de 24 a 28 dias após o florescimento, grão farináceo duro ( $R_5$ ) de 35 a 42 dias após o florescimento e a maturidade fisiológica ( $R_6$ ) de 55 a 65 dias após o florescimento (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

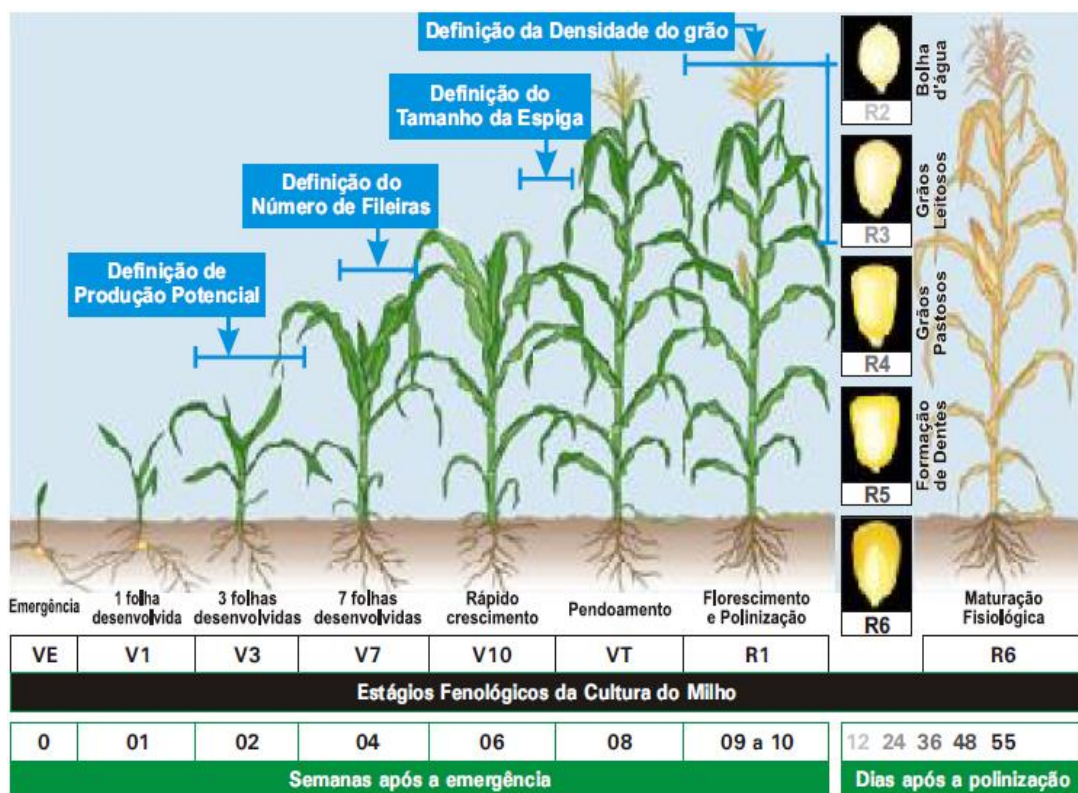


Figura 1- Fases de desenvolvimento da cultura do milho (WEISMANN, 2008).

### 2.1.2 Nitrogênio na cultura do milho

O nitrogênio é considerado um dos elementos minerais essenciais que causam maior impacto no desenvolvimento e produtividade, das plantas e, conseqüentemente, aumenta os índices de qualidade dos produtos agrícolas (VIANA, 2007).

Este nutriente é de extrema importância no incremento da produção de grãos e na elevação do teor proteico, o que pode favorecer a qualidade dos grãos (HIREL et al., 2007; TAIZ E ZEIGER, 2013).

Assim, por apresentar essas características, o nitrogênio é o nutriente que causa maiores efeitos no aumento da produtividade na cultura do milho (DUETE et al., 2008; CIVARDI et al., 2011). Além do efeito sobre a produtividade, este elemento interfere no crescimento e desenvolvimento da planta.

Estudos relatam a influência do nitrogênio no aumento da massa de mil grãos (MOTA et al., 2015), do número de espigas por planta (SORATTO et al., 2010), da altura de plantas, do peso de espigas (SCHIAVINATTI et al., 2011), do comprimento de espiga, do diâmetro do colmo (SORATTO et al., 2010; SCHIAVINATTI et al., 2011) e da produção de matéria seca (DUETE et al., 2008).

De acordo com Okumura et al. (2012), as exigências por nitrogênio na cultura do milho, variam em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, sendo mínimas nos estádios iniciais, aumentando com a elevação da taxa de crescimento e alcançando um pico no estágio de florescimento até o início da formação dos grãos. Pesquisas demonstram que o aumento de produtividade está diretamente relacionado com o uso de suplementação de nitrogênio.

Meira (2009), em experimentos avaliando diferentes dosagens e fontes distintas de N, concluiu que a produção de grãos aumenta com o acréscimo na dosagem do nutriente, porém não há diferença entre as fontes de nitrogênio utilizadas. Gomes et al. (2007) avaliando o efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agrônômicos da cultura do milho sob plantio direto, a dose máxima de 150 kg ha<sup>-1</sup> de N proporcionou maiores rendimento de grãos, teor de N nas folhas, peso de grãos por espiga e altura de plantas. No entanto, essa prática onera os custos de produção em virtude das principais fontes de nitrogênio disponíveis. Sousa et al. (2020) avaliando quatro doses de N (0, 60, 120 e 180 kg

ha<sup>-1</sup>) no plantio de milho em latossolo amarelo em sistema plantio direto observaram maior produtividade nas doses maiores de 120 e 180 kg ha<sup>-1</sup>.

Embora haja grandes avanços na forma de aplicação e o aumento no uso de fertilizantes nitrogenados, o N continuará sendo um dos fatores limitantes para produção de milho, pois exige uma grande participação dos custos de aplicações no valor total da produção, sendo que esse valor vem aumentando, o que pode assim, limitar o seu uso no futuro (SAVARY et al., 2014). Além disso, o N aplicado via fertilizante mineral pode causar poluição ambiental, se aplicado em doses excessivas (GOULDING et al., 2008).

Na cultura do milho, a adubação nitrogenada é recomendada na perspectiva de aumento da produtividade. É indicada a aplicação de um terço do N na semeadura e o restante em cobertura, visto que, na fase inicial, as plantas precisam de pouca quantidade deste nutriente (SAWAZAKI, 2001).

Contudo, a aplicação de nitrogênio via fertilizante mineral pelas culturas apresenta baixa eficiência em condições tropicais, pois apresenta grandes perdas, em razão, principalmente, da lixiviação de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), desnitrificação e volatilização tanto da ureia quanto da amônia (NH<sub>3</sub>) (ROGERI, 2010).

As plantas absorvem nitrogênio do solo na forma de nitrato, amônio, uréia e aminoácidos, prevalecendo o nitrato em grande parte dos solos por ser o produto final da utilização microbológica do nitrogênio amoniacal, onde bactérias quimiossintetizantes dos gêneros Nitrossomonas e Nitrobacter que oxidam a amônia e utilizam os elétrons removidos no seu metabolismo (WILLIAMS; MILLER, 2001).

As folhas são capazes de absorver o N nas formas gasosas NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (PING et al., 2000), dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) (SPARKS et al., 2001), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ureia e aminoácidos (FURUYA; UMEMIYA, 2002). Outra forma de suprimento do N para as plantas é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), tendo como fonte o N gasoso (N<sub>2</sub>), que compõe cerca de 78% dos gases da atmosfera.

Com a expansão das fronteiras agrícolas, intensificou-se a importação dos fertilizantes agrícolas no Brasil. Segundo a ANDA (2020), o fertilizante nitrogenado foi, em 2019 e 2020, o 2º principal produto importado pelo Brasil. Cerca de 75% do consumo é importado, sendo o maior importador mundial do produto, configurando como 4º maior consumidor, depois da China, Índia e Estados Unidos. Aliado à elevada dependência externa da importação dos fertilizantes sintéticos, corre-se o risco de enfrentar escassez dos mesmos e diminuir a produção de diversas culturas,

uma vez que estas são importantes para o país na geração de commodities ou pagar mais caro pelo produto, aumentando assim, o custo de produção, reduzindo a rentabilidade das culturas.

Entretanto, para amenizar tal situação, é necessário que se adotem e utilizem alternativas sustentáveis para reduzir essa dependência da importação dos fertilizantes nitrogenados, a fim de reduzir os custos de produção e emissão de gases de estufa atribuídos à agricultura. A FBN é uma das alternativas que tem sido recomendada, comprovadamente eficiente em culturas como a soja, entretanto, com grande potencial para outras culturas.

### **2.1.3 Doses de nitrogênio na cultura do milho**

As práticas agrícolas no manejo das culturas requerem a integração de várias áreas de conhecimento para o alcance de elevadas produtividades. Dentre as várias áreas da ciência, a fertilidade dos solos ocupa um papel fundamental quanto à aplicação correta em época, quantidade e qualidade de nutrientes para o desenvolvimento das culturas em um sistema de produção (ROCHA, 2014).

As quantidades de adubo nitrogenado a serem aplicadas são muito variáveis, dependendo da variedade e produtividade esperada. A cultura do milho pode ter incrementos significativos na produtividade de grãos com a aplicação de até 150 a 200 kg N ha<sup>-1</sup> (ARAÚJO et al., 2004). As quantidades recomendadas variam conforme o manejo da cultura (LARA CABEZAS et al., 2004), isto é, levando em conta os outros fatores de produção como cultivar (JAKELAITIS et al., 2005), época de semeadura (MAR et al., 2003), cultura anterior (ROSOLEM et al., 2004) e produtividade esperada (RAIJ; CANTARELLA, 1997).

Para se obter a máxima eficiência do fertilizante nitrogenado é importante determinar as épocas em que esse nutriente é mais exigido pelas plantas, permitindo-se assim, corrigir as deficiências que possam ocorrer durante o desenvolvimento da cultura. A eficiência da adubação nitrogenada é dependente de condições climáticas, tipo de solo, acidez, conteúdo de argila, cultivares, cultura anterior, distribuição de chuvas, níveis de fertilização nitrogenada e sua interação com outros nutrientes (SIMS et al., 1998).

A absorção de N pelas plantas de milho ocorre em todo seu ciclo vegetativo, sendo pequena no primeiro mês, aumentando consideravelmente a partir daí,

atingindo taxa superior a  $4,5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ de dia}^{-1}$ , durante todo o florescimento (CRUZ et al., 1996). Entre 25 e 45 dias, a planta de milho chega a acumular 43% do N que necessita e, entre as fases de desenvolvimento pleno, ainda vai absorver 31% de sua necessidade total (MUZILLI et al., 1989).

Bull (1993) mencionou a influência da adubação nitrogenada no aumento do índice de área foliar, da massa de 1.000 grãos, de altura de planta, da produção de biomassa e do índice de colheita na cultura do milho e ressaltou que a aplicação de N pode também influenciar indiretamente a nutrição da planta, havendo maior absorção de outros nutrientes em razão da exploração de maior volume de solo pelo aumento do sistema radicular. Para o mesmo pesquisador, quando se manteve adequado o fornecimento de nutrientes para o milho, a produção diária de matéria seca foi  $245 \text{ kg ha}^{-1}$ , enquanto em condições de extrema deficiência de N, a produção diária foi  $82 \text{ kg ha}^{-1}$ , evidenciando a importância do correto fornecimento de N para a cultura.

Em sistema de semeadura direta tem-se obtido a produção máxima calculada com a aplicação de  $96 \text{ kg N ha}^{-1}$  (CAMPOS, 2004),  $140 \text{ kg N ha}^{-1}$  (LANGE et al., 2006) e  $166 \text{ kg N ha}^{-1}$  (SILVA et al., 2005). No entanto, alguns autores (ARAÚJO et al., 2004; JAKELAITIS et al., 2005) obtiveram incrementos lineares de produtividade até dose de  $240 \text{ kg N ha}^{-1}$ .

Contudo, existe uma série de variáveis que condicionam as transformações do N no solo, que são mediadas por microrganismos, e dependem das condições edafoclimáticas, principalmente do tipo de solo, da precipitação pluvial e da temperatura (LARA CABEZAS et al., 2004); dependem, além disso, das características dos resíduos vegetais da cultura de cobertura antecessora ao milho (AMADO et al., 2002).

## **2.2 A cultura do feijoeiro: Importância e produção**

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de extrema importância para a alimentação humana em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, onde constitui a principal fonte de proteína, por apresentar baixo valor econômico, quando comparada com proteínas de origem animal (MEZIADI et al., 2016). É também uma leguminosa rica em carboidratos, minerais como ferro, vitaminas e aminoácidos essenciais (PETRY et al., 2015).

O feijão comum é uma cultura de ciclo curto e, por isso, apresenta uma vantagem para o produtor, pois, consegue adequar a sua semeadura dentro de uma janela menor, sem ter que abrir mão da produção de outros grãos ainda no mesmo ano e safra. O Brasil possui três épocas distintas de semeadura, favorecendo assim uma oferta constante do produto ao longo do ano. O feijão de primeira safra é semeado entre agosto e dezembro, o de segunda safra é cultivado entre janeiro e abril e o de terceira safra é semeado de maio a julho (CONAB, 2021).

No ano agrícola de 2020/21, o primeiro ciclo deve destinar 913,4 mil hectares para o plantio de feijão, com uma projeção de produção na ordem de 1.082,6 mil toneladas, somando os feijões do tipo comum cores, comum preto e caupi (CONAB, 2021). Segundo a mesma referência, para a produção total, incluindo as estimativas de segunda e terceira safras, a previsão é de destinação de 2.926,2 mil hectares para o cultivo do feijão comum, com uma produção esperada de 3.144,2 mil toneladas e produtividade estimada em 1074 kg ha<sup>-1</sup>.

A cultura do feijão comum constitui uma das mais representativas explorações agrícolas do Brasil em termos de área de cultivo e valor de produção. Na safra de 2019/20, o Estado do Paraná ocupou uma área de 173,8 mil hectares, com produção aproximada de 289,4 mil toneladas e produtividade de 1.665 kg ha<sup>-1</sup> para o feijão comum (CONAB, 2020).

Na safra de 2020/2021, no Paraná, o ritmo de plantio foi afetado pelos períodos de estiagem, resultando em uma semeadura bastante escalonada. Dessa forma, as lavouras estão nos mais diversos estádios, desde o desenvolvimento vegetativo até a colheita. Esta última começa a ganhar maior intensidade e chegou aos 30% da área semeada (44,5 mil hectares) ao final de dezembro de 2020. Ao todo, a expectativa nessa primeira safra é que sejam colhidas 86,6 mil toneladas no estado (CONAB, 2021).

A preferência do consumidor brasileiro é regionalizada e diferenciada, em relação à cor e ao tipo de grão. O feijão do tipo carioca é o mais cultivado, e representa 70% do consumo do brasileiro, sendo apreciado em todas as regiões do Brasil (MAPA, 2021). O feijão preto é o segundo grão mais consumido, com 20% de preferência, e tem mais aceitação nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e parte do Espírito Santo (FARIA et al., 2014).

Apesar de apresentar produtividade nacional estimada em 1.074 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2021), o feijoeiro está em processo de transição tecnológica, deixando de

ser de agricultura familiar para altamente um sistema altamente tecnificado (PEREIRA et al., 2004). O feijoeiro é explorado em sistemas bem variados onde o alto nível tecnológico proporciona produtividades superiores a 4500 kg ha<sup>-1</sup> (MAPA, 2021).

O aumento da produtividade é uma tarefa contínua e pesquisas têm sido frequentemente realizadas para melhorar o desempenho da cultura, desde a otimização da irrigação, experimentos visando a adaptabilidade de cultivares em cada região (VIEIRA et al., 2014), realização da calagem (SILVA et al., 2011), adequada nutrição mineral (SANTI et al., 2013), inoculação de sementes com bactérias fixadoras de nitrogênio (ALBUQUERQUE et al., 2012; MATOSO; KUSDRA, 2014), entre outras práticas.

### **2.2.2 Características e fenologia do feijão comum**

O feijão comum é uma planta da família fabácea, anual, herbácea e apresenta hábitos de crescimento determinado ou indeterminado, que combinados com o porte da planta e ramificação do caule, apresenta-se sob quatro tipos morfológicos: Tipo 1, hábito de crescimento determinado, arbusto e porte de planta ereto; tipo 2, hábito de crescimento indeterminado, arbusto, com porte de planta ereto e caule pouco ramificado; tipo 3, com hábito de crescimento indeterminado, prostrado ou semi-prostrado com ramificações bem desenvolvidas e abertas e; tipo 4, com crescimento indeterminado, trepador, caule com forte dominância apical e número reduzido de ramos laterais (SANTOS; GAVILANES, 1998).

Segundo Portes et al. (2009) o ciclo do feijão comum é caracterizado por duas fases sendo a vegetativa, que tem seu início com a germinação da semente e estende-se até o aparecimento dos primeiros botões florais, e a fase reprodutiva, que inicia desde o florescimento e finaliza com a maturação fisiológica de grãos.

A escala fenológica proposta por GEPTS & FERNÁNDEZ (1982) e citada por FANCELLI (1990) é a mais utilizada. O ciclo é dividido em 10 estádios denominados por uma letra e um número, a letra V se refere à fase vegetativa e a letra R, à reprodutiva: germinação (V0); emergência (V1); aparecimento de folhas primárias (V2); surgimento de folha trifoliolada (V3); terceira folha trifoliolada (V4); surgimento do primeiro botão floral (R5); a abertura da flor (R6); primeira vagem (R7); enchimento das vagens (R8) e maturação fisiológica (R9) (Figura 2).

Esta cultura pode ser cultivada em várzeas e em terras altas, isentas de encharcamento, preferencialmente em áreas com pouca declividade ou quase planas, desde que em solos soltos e friáveis, visto que o maior volume radicular se situa nos primeiros 20 cm de profundidade e com 80% a 90% das raízes localizadas nos primeiros 40 cm (RIBEIRO et al., 2011).

Para Yokoyama et al. (1996) existem vários fatores que influenciam a produtividade do feijão comum, desde a temperatura, a precipitação e a distribuição de nutrientes. Quanto às necessidades nutricionais do feijão, essas variam dependendo da produtividade esperada das cultivares, sendo os macronutrientes mais requeridos pela cultura.

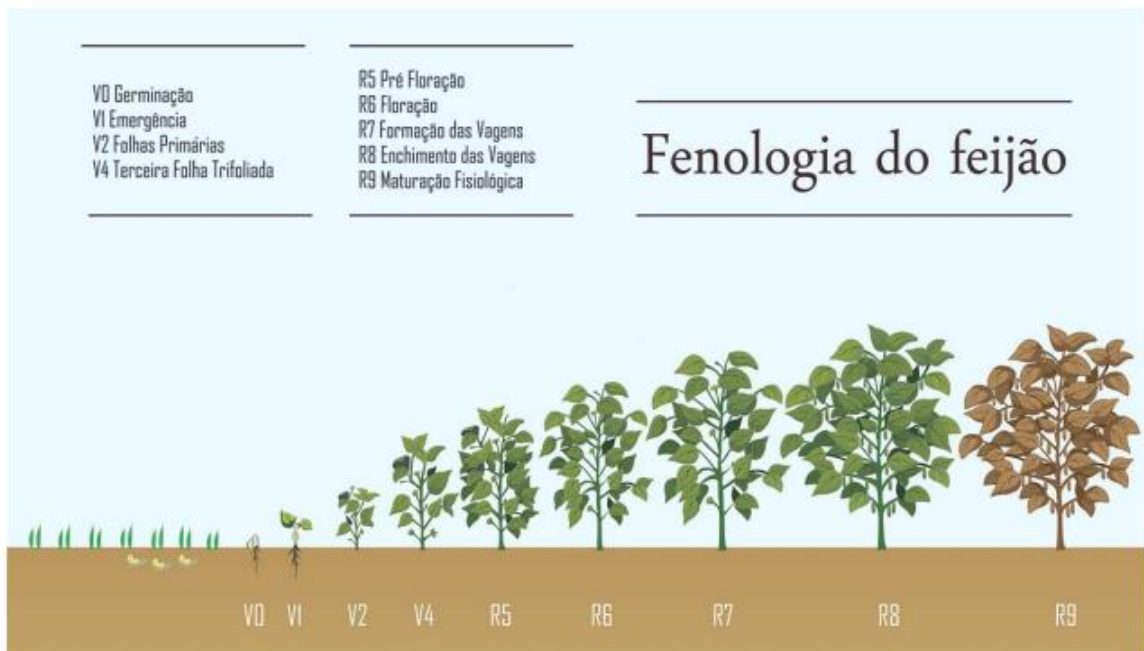


Figura 2- Fases de desenvolvimento da cultura do feijão comum (COOPERTRADIÇÃO, 2019).

### 2.2.3 Importância do nitrogênio na cultura do feijoeiro

A cultura do feijão comum, por ser uma espécie de ciclo curto e apresentar pequena profundidade de raízes, necessita que os nutrientes essenciais para o seu crescimento, desenvolvimento e produção sejam fornecidos no decorrer de um curto espaço de tempo e em quantidades adequadas (ALMEIDA et al., 2000).

Para Arf et al. (2011) e Viana et al. (2011), o nitrogênio é um nutriente essencial e indispensável para a produção do feijoeiro. Porém, a adubação

nitrogenada deve propiciar uma boa nutrição para a planta até o período do florescimento. A aplicação de N através da adubação resulta em aumento de produção de massa seca e do número de vagens por planta, o que, conseqüentemente, pode proporcionar ganhos significativos em produtividade de grãos.

O uso irregular de fertilizantes na agricultura é o principal responsável pela contaminação das águas subterrâneas e superficiais. Esse uso inadequado aumenta as perdas de N no ambiente, nas formas como amônia ( $\text{NH}_3$ ), amônio ( $\text{NH}_4$ ), óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3$ ) (FAO, 2013). A nível mundial, o setor da agricultura e da pecuária, são responsáveis pela emissão de 2/3 do  $\text{N}_2\text{O}$  para atmosfera (GALLOWAY et al., 2003).

De acordo com Figueiredo (2012), a utilização da adubação nitrogenada é dispendiosa, responde pouco às demandas da planta e pode causar danos ambientais, uma vez que sua perda por lixiviação e escoamento superficial contamina os solos e lençóis freáticos, assim, a estimativa de aproveitamento desses adubos é de cerca de 50% da quantidade aplicada.

Em pesquisa realizada por Valderrama et al. (2009) avaliando quatro doses de N em cobertura (0, 40, 80 e 120 kg N ha<sup>-1</sup>) na forma de ureia e ureia revestida e quatro doses de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (0, 50, 100 e 150 kg ha<sup>-1</sup>) na forma de super fosfato triplo e super fosfato triplo revestido, observaram que independentemente da fonte de N, o feijão comum apresentou resposta linear às doses de adubos nitrogenados para teor do N-foliar e produtividade de grãos.

Moreira et al. (2013) avaliando o desempenho agrônômico do feijoeiro com quatro doses idênticas de N em semeadura e cobertura (0, 40, 80 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) não observaram diferença significativa entre doses de N em semeadura e/ou cobertura para o número de grãos por vagem e para o peso de 100 grãos. Considerando apenas a adição de N em semeadura, o número de vagens por planta e o rendimento de grãos se elevaram com o incremento da dose até 120 kg N ha<sup>-1</sup>.

Santana et al. (2020), avaliando a produção de feijão-de-corda sob diferentes doses de N aliado à aplicação de boro, verificaram que a aplicação de diferentes doses de N interferiu significativamente nas médias de produção de vagens por planta, peso de cem grãos (grãos verdes) e número de grãos por vagem, sendo que as aplicações de 100 e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N foram as que apresentaram os melhores resultados.

Em uma tentativa de suprir a necessidade de nitrogênio, as plantas conseguiram desenvolver habilidades para realizar associações com microrganismos que fixam este elemento através do estabelecimento de simbiose mutualista com determinadas espécies de bactérias da família *Rhizobiaceae*. Assim, a cultura do feijoeiro pode se beneficiar do N fixado por este processo biológico. Porém, ao contrário do que ocorre com a cultura da soja, no feijoeiro, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) não é capaz de suprir a necessidade de N da cultura (MATOSO; KUSDRA, 2014).

Na associação simbiótica entre bactérias gênero *Rhizobium* e plantas da família das leguminosas, há formação de nódulos e ambos os organismos são beneficiados, pois a leguminosa fornece fonte de carbono às bactérias e estas por sua vez, fornecem o N necessário ao desenvolvimento da planta (SILVA, 2012).

O nitrogênio acumulado pela cultura do feijoeiro é provido do processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio, seguido do N contido no solo e através de fertilizantes aplicados. A aplicação de doses elevadas de N, principalmente durante a semeadura proporciona redução da fixação biológica de nitrogênio, sendo a cultura favorecida pela adubação de arranque (BRITO et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; ANDRADE, 2014).

A associação do feijão com espécies de bactérias do grupo dos rizóbios, principalmente *Rhizobium tropici*, é uma tecnologia capaz de substituir a adubação nitrogenada, total ou parcialmente, reduzindo o custo de produção e proporcionando altos rendimentos na cultura (GRANGE et al. 2007, PELEGRIN et al. 2009, TOZLU et al. 2012).

### **2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio associativa e de vida livre**

A maioria dos microrganismos fixadores de nitrogênio é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, podendo ser encontrados em simbiose com várias espécies vegetais. Quando as relações entre microrganismos e plantas são menos especializadas, os mesmos recebem denominação de associativos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Segundo Lopes (2007), os microrganismos fixadores de N mais estudados podem ser agrupados da seguinte forma: cianobactérias, rizóbios, franckia (LOPES, 2007), bactérias de vida livre e associativas com elevado potencial biotecnológico

(*Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derxia spp.*, *Paenebacillus azotofixans*), bactérias diazotróficas associativas (*Azospirillum spp.* e *Burkholderia spp.*) ou bactérias diazotróficas endofíticas (*Herbaspirillum spp.* e *Burkholderia spp.*) (MOREIRA et al., 2010). Para o presente estudo serão abordadas as cianobactérias, rizóbios e bactérias diazotróficas associativas, especificamente o *Azospirillum*.

### 2.3.1 Cianobactérias

As cianobactérias (algas azuis-verdes) são seres procariontes assim como bactérias do tipo Gram-negativas que realizam fotossíntese oxigênica (oxifototróficas) e utilizam tipicamente a água como doadora de elétrons (WHITTON; POTTS, 2000). Contudo, a fotossíntese aeróbica é incompatível com a fixação de nitrogênio, uma vez que a nitrogenase é inativada por oxigênio (KUMAR et al., 2010). Deste modo, as cianobactérias utilizam dois mecanismos principais para separar essas atividades: um temporal e outro espacial. A primeira ocorre segundo o ciclo circadiano, no qual há o armazenamento de glicogênio durante o dia e fixação de nitrogênio durante a noite (TOEPEL et al., 2009), sendo comum em alguns gêneros unicelulares. A outra forma ocorre por meio de células diferenciadas denominadas heterócitos, sendo um mecanismo exclusivo de espécies de cianobactérias filamentosas (Sandh et al., 2009; Kumar et al., 2010).

Os fotossistemas I e II e clorofila a, estão presentes no aparato fotossintético da membrana dos tilacóides de todas as espécies, inclusive ficobiliproteínas arranjadas nos ficobilissomos atados à membrana externa dos tilacóides (LEE, 1999). Alguns representantes do grupo apresentam ainda, clorofila b (*Prochloron didemni*), clorofila d (*Acaryochloris marina*) e recentemente foi descrita uma nova clorofila em estromatólitos, a clorofila f (CHEN et al. 2010).

De acordo com Komárek (2006) as cianobactérias são os únicos organismos oxifototróficos que contêm mecanismos e adaptações para fixar N atmosférico, e todas estas características adaptativas permitem que as cianobactérias colonizem os mais variados ambientes: terrestre, marinho, de água doce, além de ambientes extremos como fontes termais, geleiras, desertos, rochas nuas, lagoas alcalinas e hipersalinas.

Registros fósseis indicam que as cianobactérias surgiram na Terra há mais de 3,5 bilhões de anos, sendo que sua grande proliferação ocorreu há cerca de dois bilhões de anos. São organismos unicelulares que apresentam na sua estrutura filamentos ou colônias multicelulares com quase nenhuma diferenciação (PINOTTI; SEGATO, 1991).

Segundo Fleming e Haselkorn (1973), as cianobactérias possuem na sua estrutura dois tipos de células especializadas chamadas de heterocistos e acinetos, sendo que os heterocistos protegem a enzima nitrogenase do oxigênio, catalizando a conversão do  $N_2$  em amônia, tornando o N disponível e se desenvolvem a partir de células vegetativas. Em relação aos acinetos, são células resistentes a condições ambientais desfavoráveis. Para Barsanti e Gualtieri (2006), a reprodução das cianobactérias é assexuada, ocorrendo ou por divisão celular, fracionamento de colônias, formação de hormogônios ou acinetos.

As cianobactérias apesar de sobreviverem em vida livre, também estabelecem associações com diversos membros do reino vegetal e podem contribuir em grandes proporções com o nitrogênio fixado (PRASANNA et al., 2012). Tem destaque neste ponto a colonização de cianobactérias em ambientes pobres em nitrogênio, ou associadas à filosfera das plantas em ambientes naturais.

Pesquisas realizadas utilizando cianobactérias despertam interesse em diversas áreas quanto ao potencial biotecnológico que elas apresentam, principalmente devido à capacidade de produzir compostos bioativos, tais como toxinas, sideróforos e antibióticos com diversas propriedades farmacológicas (NAGARAJAN et al., 2011).

Em relação à agricultura, destaca-se o potencial da sua biomassa utilizada como biofertilizantes do solo. No solo encontram-se espécies terrestres de cianobactérias que são organismos benéficos para a fertilidade, que apresentam a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, auxiliam na agregação das partículas do solo produzindo metabólitos, e com isso, permitir a manutenção da umidade, reduzindo os riscos de erosão (SHARIATMADRI et al., 2013).

Quanto à exploração dos benefícios das cianobactérias em culturas com interesse econômico, a prática mais conhecida e consolidada é a inoculação das mesmas no feijão comum (PICHARDO; PFLUGMACHER, 2011), na cultura de milho (GAVILANES et al., 2020), na cultura de trigo (EL-SHINNAWIL et al. 2016), na soja (JADHAV; TALEKAR, 2020) e na cultura do arroz (JING et al. 2019).

A associação das cianobactérias com outras bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de N aumentam o fornecimento desse nutriente às plantas (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014) como a coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* que aumenta o rendimento de grãos de híbridos de milho (GAVILANES et al. 2020), a co-inoculação de rizóbio, *Azospirillum*, e cianobactéria em aumento produção de feijão comum (HORÁCIO et al., 2020).

A fertilidade dos solos nos campos de cultivo do arroz é mantida pela atividade de cianobactérias heterocísticas que ocorrem de forma abundante nesses campos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Estas cianobactérias, além de fixarem biologicamente o N, também secretam substâncias nitrogenadas, contribuindo para o aumento da decomposição de matéria orgânica no solo (MOS). Os benefícios da FBN no cultivo do arroz são mais visíveis em campos alagados, em que se observa a presença da *Azolla*, uma planta pteridófita que tem como endossimbionte a cianobactéria *Anabaena*, esta que se encarrega na fixação do N (FIORE et al., 2005).

Devido ao potencial agrícola das cianobactérias como biofertilizantes na cultura do arroz, torna-se necessário avaliar a sua viabilidade agrônômica em várias culturas, com vista a verificar também o seu efeito. Em geral, entre os microrganismos fotossintetizantes, as cianobactérias destacam-se como um dos maiores grupos de produtores primários de MO e fixadores de N<sub>2</sub>. Diversas espécies de cianobactérias são capazes de transformar a molécula de gás N<sub>2</sub> em amônia, que posteriormente será assimilada em aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados existentes nas suas células (REVIERS, 2010).

Para o caso específico deste estudo foi avaliada a eficiência das espécies *Anabaena cilíndrica* e *Calothrix brevíssima*, associadas ao rizóbio no feijão e ao *A. brasilense* na cultura de milho, respectivamente.

### **2.3.1.1 *Anabaena cylindrica***

*Anabaena* é um gênero de cianobactérias filamentosas, fotoautotróficas de reprodução assexuada, formadoras de heterocistos, produzem oxigênio pela fotossíntese, crescem em filamentos longos de células vegetativas, pertence a classe *cyanophyceae*, ordem *Nostocales* e família *Nostocaceae*. Elas são conhecidas por habilidades de fixação de nitrogênio e formam relações simbióticas

com certas plantas (STARR et al., 2013).

Para Shih et al (2013) comumente, maior parte das espécies do gênero *Anabaena* podem ser encontradas em águas continentais (água doce) e apresentam um tamanho de 7,06 Mpb.

Algumas cianobactérias do gênero *Anabaena* que são produtoras de pigmentos de interesse comercial como “clorofila a”, ficobilinas, polissacarídeos, também têm sido utilizadas como biofertilizantes (LORETO et al., 2003).

Segundo Itou et al. (2001) a *Anabaena cylindrica*, além de contribuir na fixação de N, também tem atividade na solubilidade do ferro por produzir sideróforos. Para Patel et al., (2017), a sua a biomassa pode ser utilizada na produção de biodiesel. De acordo com Fay (1969), a diferenciação celular em *Anabaena cylindrica* caracteriza-se em alterações características na composição dos pigmentos de heterocistos e esporos.

Poucas pesquisas que relatam sobre a inoculação de *A. cylindrica*. Das pesquisas existentes relatam o potencial da inoculação e coinoculação de *A. cylindrica* com outros microrganismos. Zambrano et al. (2020) avaliando a coinoculação de *A. cylindrica* com *A. brasilense* no rendimento de grãos de híbridos de milho demonstram que os híbridos de milho apresentaram comportamento semelhante, independentemente da inoculação ou coinoculação com *A. brasilense* e *A. cylindrica*, recomendando esses microrganismos como inoculantes. Horacio et al. (2020) avaliando a coinoculação de rizóbio (*R. topici* + *R. freirei*), *Azospirillum brasilense* e cianobactérias da espécie *A. cylindrica*, observaram maior nodulação, maior crescimento da planta e maior produção do feijão comum com a cultivar IPR Campos gerais.



Figura 3 - Cianobactéria *Anabaena cylindrica* (<https://utex.org/products/utex-b-0629>).

### 2.3.1.2 *Calothrix brevissima*

A cianobactéria *Calothrix brevissima*, pertencente também a classe *cyanophyceae*, ordem *Nostocales* e família *Rivulariaceae*, apresenta filamentos com comprimento até de 60  $\mu\text{m}$  na sua estrutura e as suas células possuem de 4-5  $\mu\text{m}$  de largura, estritamente estrangidas nas paredes cruzadas. A sua cor característica é verde oliva, com célula apical arredondada e heterocisto basal hemisférico a esférico (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Não há relatos de pesquisas realizadas sobre a utilização da *Calothrix brevissima* como inoculante agrícola. Para Habib et al. (2011) a *Calothrix* sp. é uma das cianobactérias dominantes em campos de arroz das áreas úmidas. Elas enriquecem o solo com nitrogênio e carbono, atuam na solubilização de fosfatos, contribuindo assim na melhoria da agregação do solo.

A *Calothrix brevissima* quando cultivada em meio sem N forma um heterocisto basal seguido de um filamento de células de tamanho decrescente. Quando cultivado num meio com nitrato não forma heterocistos, mas permanece o afunilamento dos filamentos. Contrariamente, a polaridade assim como a diferenciação de heterocistos é perdida no crescimento em meio com amônio e observa-se a formação frequente de ramos falsos (RAI et al., 1978).



Figura 4 - Cianobactéria *Calothrix brevissima*  
([http://www.kpabg.ru/cyanopro/sites/default/files/Calothrix\\_brevissima\\_1.JPG](http://www.kpabg.ru/cyanopro/sites/default/files/Calothrix_brevissima_1.JPG)).

### 2.3.2 Rizóbios

Rizóbios são bactérias fixadoras de N que nodulam em raízes de leguminosas. São conhecidas coletivamente como rizóbios devido ao fato que a primeira espécie descrita foi *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889). Incluem-se nesse grupo às bactérias de diversos gêneros (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*) e outras espécies que estabelecem simbiose com a maioria das leguminosas. Este grupo caracteriza-se como o mais eficiente em virtude de uma parceria vegetal e microrganismo, considerado o processo de simbiose muito evoluído. A simbiose de leguminosas com os rizóbios caracteriza-se pela formação de nódulos nas raízes e caules (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Plantas que apresentam quantidades significativas de nódulos nas raízes e/ou caule têm suprida toda sua demanda por nitrogênio. Pesquisas realizadas com esse grupo de bactérias são muito avançadas, sendo que há estirpes específicas de alta eficiência, selecionadas para várias culturas; com a produção comercial de inoculantes com elevada concentração de bactérias, para que o processo de inoculação seja o mais eficiente e produtivo. No Brasil, o sistema de inoculação com bactérias dos gêneros rizóbios, principalmente para a cultura da soja, é considerado o sistema mais viável economicamente e ecologicamente como fonte de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2001).

A cepa bacteriana fixadora de N<sub>2</sub> simbiótica PRF81 isolada do solo do sul do estado do Paraná, no Brasil, geralmente referida como *Rhizobium tropici*, foi reclassificada como *R. freirei* (DALL'AGNOL et al., 2013). Esta cepa PRF81 (= SEMIA 4080) é muito eficaz na fixação de N em condições de campo e tem sido utilizada com sucesso em milhares de doses de inoculantes comerciais para o feijoeiro, combinados ou não com a cepa *R. tropici* CIAT899 (= SEMIA4077).

As respostas do feijoeiro à inoculação com cepas de rizóbio foram relatadas por Hungria et al. (2000) e por Soares et al. (2006) que combinou a inoculação de rizóbio com a aplicação de N-uréia, o que aumentou a produtividade da cultura. Em um estudo realizado por Chekanai et al. (2018), os autores demonstraram que existem cultivares de feijão melhoradas, responsivas à inoculação de rizóbio, e que existem solos que não respondem a essa prática, principalmente aqueles degradados. Pacheco et al. (2020) avaliando diferenças na contribuição da fixação

biológica de nitrogênio para o desempenho produtivo de cultivares de feijão pela técnica de abundância natural  $^{15}\text{N}$ , observaram que as plantas de feijoeiro dependentes de FBN foram capazes de alcançar altas produtividades, muito próximas às plantas supridas com alta taxa de N-fertilizante, na dose de  $90 \text{ kg N ha}^{-1}$ , usando a ureia). Horacio et al. (2020) avaliando a coinoculação de rizóbio (*R. topici* + *R. freirei*), *Azospirillum* e cianobactéria da espécie *Anabaena cylindrica* observaram maior nodulação, maior crescimento da planta e maior produção do feijão comum com a cultivar IPR Campos gerais.

### 2.3.3 Bactérias Diazotróficas Associativas

São microrganismos capazes de associar-se com todos os tipos de plantas, e para inoculação, são de interesse com a família *Poaceae*. As principais atribuições de importância agrícola referenciadas destes microrganismos são a FBN, a produção de substâncias que auxiliam no crescimento radicular, aumento da colonização micorrízica, e aumento na eficiência de absorção de nutrientes e, conseqüentemente, na produtividade. Devido a este aspeto, também são consideradas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) assumindo papel importante no que diz respeito à interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros (MOREIRA et al., 2010).

Para Moreira; Siqueira (2006), as espécies mais comumente encontradas são: *Azospirillum* spp. (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraefans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*) entre outras pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum*, *Paenabacillus*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Derxia*, *Pantoea* e *Serratia*.

As bactérias diazotróficas associativas podem ser agrupadas em três categorias de acordo com a sua localização na planta, que pode ser ao redor das raízes, formando assim o primeiro grupo de organismos rizosféricos, pois colonizam principalmente a rizosfera, ou dentro das raízes, formando assim, o segundo grupo dos endofíticos facultativos, pois colonizam tanto a parte interna quanto a externa das raízes. Finalmente, temos o terceiro grupo de endofíticos obrigatórios, considerado o mais importante por colonizar o interior de raízes e parte aérea das plantas (BALADANI et al., 1997).

Os efeitos das bactérias de promoção de crescimento de plantas ocorrem de forma direta por meio de mecanismos de fixação de nitrogênio, síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fosfato e mineralização de nutrientes, e de forma indireta através de mecanismos como indução de resistência sistêmica, redução de fatores de estresse, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2003).

A especificidade da interação entre as BPCPs e as plantas varia de acordo com as características genéticas das espécies envolvidas. Além disso, a eficiência destes microrganismos pode ser influenciada por outros fatores, como a quantidade e qualidade dos microrganismos inoculados, o método usado para inoculação, a estirpe bacteriana, a fase de desenvolvimento da cultura no ato da inoculação, as condições edafoclimáticas, interações com a microbiota nativa, a fitossanidade das plantas, adição inadequada de nutrientes no solo através da fertilização e muitos outros (MELNICK et al., 2008; MATSUMURA et al., 2015; CORDEIRO, 2017).

Em pesquisa desenvolvida por Mariano et al. (2004), os autores afirmam que as BPCPs podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao solo, tubérculos ou raízes, pulverizadas nas partes aéreas, incluindo folhas e frutos, e também em pós colheita.

### **2.3.3.1 Gênero *Azospirillum***

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCP de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da terra; há relatos, também, de que as bactérias desse gênero podem ser endofíticas facultativas (DOBEREINER; PEDROSA, 1987; HUERGO et al., 2008).

Essas bactérias, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de N<sub>2</sub>, se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (HUNGRIA et al., 2007). Para os autores, estas bactérias são capazes de promover maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de plantas, promovendo então, melhor absorção de água e nutrientes, podendo ocasionar maior crescimento, desenvolvimento e produtividade.

A sua ação na melhoria do desenvolvimento do sistema radicular de plantas, pode também condicionar em maior absorção de água e nutrientes, maior tolerância

a estresses, melhorando assim o vigor e a produção das culturas (DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN et al., 2004), e também contribuem para maior tolerância a fitopatógenos (CORREA et al., 2008). Bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido associada à diversas espécies de plantas com interesse comercial, como o milho (REPKE et al., 2013; MULLER, 2013), cana de açúcar (LOPES, 2013; SCHULTZ et al., 2012) e trigo (MENDES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014; LEMOS et al., 2013).

Esta bactéria possui ampla faixa de hospedeiros e a sua presença foi confirmada na rizosfera de mais de 100 espécies de plantas (BASHAN; HOLGUIN, 1997). O *Azospirillum* em associação com a plantas, é mantido pelos exsudatos das raízes, que servem como fonte de carbono e energia (BALDANI et al., 1997), e interfere favoravelmente no crescimento das plantas destacando-se a estes, a síntese de fitormônios (HUNGRIA, 2011).

Barassi et al. (2008), relatam que resultados de pesquisas sobre inoculação com o *Azospirillum* mostram melhoria dos aspectos fotossintéticos das folhas como teor de clorofila e condutância estomática, maior produção de biomassa, de altura de plantas, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, aumento no teor de água do apoplasto, melhor elasticidade da parede celular. Verma et. al. (2001) afirmam que além da fixação do N atmosférico, estas bactérias podem atuar na solubilização do fosfato inorgânico em associação com gramíneas. Dobereiner et al. (1976) afirmam que o *Azospirillum* contribui com parte de N necessário às plantas. Por outro lado, para Repke et al. (2013), é necessária uma suplementação de N na forma de adubo nitrogenado mesmo com a inoculação de sementes com a bactéria.

A espécie *Azospirillum brasilense* é uma das mais estudadas, com diversas pesquisas por todo Brasil e no mundo (BASHAN et al., 2004). Em 1996, a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná, do Departamento de Bioquímica Molecular, se uniram na realização de ensaios laboratoriais e testes agrônômicos a campo com *Azospirillum*.

De acordo com os critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram testadas e selecionadas estirpes de *Azospirillum* que apresentavam maior promoção de crescimento das plantas, maior sobrevivência no solo e maior adaptação às técnicas utilizadas na cultura do milho. Foram realizados vários

experimentos a campo em diversas safras, no qual surtiu a seleção de estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7), autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para a cultura do milho (HUNGRIA, 2011).

Desta forma, as indústrias produtoras de inoculantes preferem produzi-los com a combinação de estirpes AbV5 + AbV6 de *Azospirillum brasilense* devido à eficácia dos mesmos nas culturas do milho e do trigo (HUNGRIA, 2011).

Para o caso específico do milho, em diversos trabalhos observam-se benefícios do uso de inoculantes do gênero *Azospirillum*, tais como aumento na produtividade de grãos, aumento da matéria seca, acúmulo de N na parte aérea (OKON; LANBADERA-GONZALES, 1994). Esses benefícios, principalmente na produtividade não é correlacionado apenas com o aumento de N, mas também como os nutrientes P e K (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004).

A maior parte das pesquisas tem recomendado a inoculação com *Azospirillum* com vista a redução do uso de fertilizantes nitrogenados, o que pode chegar até 50% (HUNGRIA, 2010).

Entretanto, cabe-se ressaltar que a associação do *Azospirillum* com a planta torna-se mais eficiente quando a cultura é adubada com N, comparado com o efeito da bactéria de forma isolada (DIDONET et al., 1996), sendo essas doses variadas de acordo com as condições de cada estudo. Alves et al., (2020) avaliando o rendimento de grãos de milho inoculado com *A. brasilense* das estirpes BR11147 e BR11005 com aplicação de fertilizante nitrogenado, observaram que a inoculação associada a uma dose de 100 kg N ha<sup>-1</sup> aumentou a produtividade em 1.230 e 614 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo 37% e 19% maior que o controle não inoculado e não adubado.

#### **2.4 Coinoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas e de vida livre**

Considerando-se os efeitos promovidos pelos diferentes grupos de bactérias e vislumbrando-se as perspectivas que sua aplicação poderia agregar em termos de crescimento das plantas, iniciaram-se o desenvolvimento de trabalhos com objetivo de combinar diferentes microrganismos. Pode-se destacar especificamente a associação entre as cianobactérias e bactérias de promoção de crescimento de plantas em gramíneas, assim como entre bactérias promotoras de crescimento e

rizóbios em leguminosas. Esta prática visa avaliar as respostas das plantas em termos de desenvolvimento vegetativo, resistência a condições de estresse, FBN e produtividade das culturas.

A tecnologia de coinoculação consiste na associação de diferentes microrganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos quando utilizados na forma isolada (BARBARO et al., 2008).

Jarak et al. (2012) avaliando os efeitos das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em milho, tanto em casa de vegetação quanto em experimento em campo, verificaram melhores resultados na coinoculação de cepas utilizadas indicando que a co-inoculação teve vantagem sobre a inoculação única. Dartora et al. (2016) avaliando a coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropediceae* na cultura do milho observaram que a coinoculação de estirpes proporcionou incremento de 12% no teor de P-foliar em relação ao controle. Na associação entre cianobactérias e bactérias promotoras de crescimento de plantas também tem-se/foi verificado bom desempenho na sua associação. Portanto, Gavilanes et al. (2020) avaliando a coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* observaram aumento do rendimento de grãos de híbridos de milho.

A associação de rizóbios com outras BPCPs tem se mostrado como alternativa promissora para aumento do crescimento das plantas, melhoria da nodulação e otimização da fixação de N<sub>2</sub> em leguminosas como caupi (ARAÚJO et al., 2012; LIMA et al., 2011) e soja (FACHINELLI; CECCON, 2020; HUNGRIA et al., 2013).

Prando et al. (2019) obtiveram ganhos de produtividade com média de 8,3%, com a soja coinoculada com *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* em diversos locais no estado do Paraná. Schossler et al. (2016) verificaram maior massa de mil grãos (253,36 g) e a maior produtividade (2.448,45 kg ha<sup>-1</sup>) do feijoeiro na coinoculação com *Rhizobium tropici* + *Azospirillum brasilense*. Hungria et al. (2012) em feijoeiro-comum a inoculação das sementes com *Rhizobium tropici* aumentou a produtividade, em média de 98 kg ha<sup>-1</sup> (8,3%), enquanto a coinoculação com *A. brasilense* no sulco resultou em incremento médio de 285 kg ha<sup>-1</sup> (19,6%).

Recentemente, Zeffa et al. (2020) realizaram uma quantificação dos efeitos da coinoculação de *Bradyrhizobium* e BPCP na cultura da soja usando uma abordagem

de meta-análise. Os autores descobriram que a tecnologia de coinoculação resultou em um aumento significativo no número de nódulos (11,40%), biomassa de nódulos (6,47%), biomassa de raízes (12,84%) e biomassa de rebentos (6,53%). Em pesquisa realizada por Barbosa et al. (2020) avaliando a adubação nitrogenada, inoculação e coinoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* na cultura do feijão comum, observaram que a inoculação e coinoculação resultaram em parâmetros produtivos equivalentes ao feijoeiro adubado com fertilizantes nitrogenados minerais.

Diversos estudos relatam benefícios da coinoculação de rizóbios com bactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura da soja, como o favorecimento da precocidade da nodulação (CHIBEBA et al., 2015), o aumento de nódulos em feijão-caupi (COSTA et al., 2013), e incremento do rendimento de grãos (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; HUNGRIA et al., 2015).

Dardanelli et al. (2008) avaliando a interação de *A. brasilense* e *R. tropici* no feijoeiro, cultivar Negro jamapa, em meio de cultura sob estresse salino, constataram que a coinoculação favoreceu o crescimento de plantas, aumentando o sistema radicular, atividades de redução do acetileno, absorção de fósforo e potássio além de promover melhor aproveitamento do ferro e molibdênio, essenciais para a FBN. Resultados de dois anos de experimentos de campo mostraram que a coinoculação com *Rhizobium* cepa RB 133 e *Pseudomonas fluorescens* cepa P-93, resultou no aumento da nodulação, maior matéria seca da parte aérea e fixação de nitrogênio, bem como produção e teor de proteína nos grãos de feijão (YADEGARI et al., 2010).

A superioridade da coinoculação sobre os demais tratamentos é devido aos efeitos combinados que as duas bactérias proporcionam, aumentando o número de nódulos, a massa dos nódulos, o comprimento e a massa das raízes (HUNGRIA et al., 2013; AUNG et al., 2013), propiciando maior aporte de N para a planta e aumentando sua capacidade em absorver água e nutrientes devido ao maior volume de solo explorado. Steiner et al. (2019) avaliando a coinoculação de *R. tripoci* e *A. brasilense* observaram que a inoculação com *R. tripoci* isolado ou combinado com *A. brasilense* melhorou a nodulação radicular e o rendimento de grãos do feijão comum quando a cultura foi cultivada durante a estação seca na região do cerrado brasileiro. Horácio et al. (2020) obtiveram maior nodulação, maior crescimento da planta e maior produção de feijão com a cultivar IPR Campos gerais ao avaliar a coinoculação de rizóbio (*R. tropici* + *R. freirei*), *A. brasilense* e cianobactéria da espécie *A. cylindrica*.

Porém, torna-se importante ressaltar que existem poucas pesquisas no Brasil com inoculantes contendo bactérias adaptadas e consolidadas às condições agroclimáticas do país com o *A. brasilense* e *R. tropici*. Por outro lado, são poucos os relatos sobre a associação de cianobactérias com *R. tropici*, com *A. brasilense* ou ambos que demonstrem efeitos positivos na cultura do feijão comum.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, H. C.; PEGORARO, R. F.; VIEIRA, N. M. B.; AMORIM, I. J. F.; KONDO, M. K. Capacidade nodulatória e características agronômicas de feijoeiros comuns submetidos à adubação molíbdica parcelada e nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 214-221, 2012.
- ALMEIDA, C.; CARVALHO, M. A. C.; ARF, O.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Ureia em cobertura e via foliar em feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 293-298, 2000.
- ALVES, G. C.; SOBRAL, L. F.; REIS, V. M. Grain yield of maize inoculated with diazotrophic bacteria with the application of nitrogen fertilizer. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, n. 3, p. 644-652, 2020.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 241-248, 2002.
- AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 467-473, 2005.
- ANDRADE, D.; COLOZZI FILHO, A. Microalgae of continental waters. Volume 2: production of biomass and co-products. **Microalgas de águas continentais volume 2: produção de biomassa e coprodutos**, 2014. ISSN 8588184494.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Produção de biomassa e coprodutos**. 1. ed. Londrina: IAPAR, 2014.
- ANDA, **Associação nacional para difusão de adubos**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/estatistica/comentarios.pdf>> Acesso em: 15 de janeiro de 2021.
- ANDRADE, C. L. T.; BRITO, R. A. L. Embrapa milho e sorgo sistema de produção, irrigação, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho/iviabili.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja coinfestada com *bacillus subtilis* e *bradyrhizobium japonicum/bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1633-1643, 1999.
- ARAÚJO, L. A. N.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.
- ARAÚJO, I. B.; FURTINI NETO, A. E.; RESENDE, A.V. ; ALVES, V. M. C.; MENDES, B. R. Fontes e modos de aplicação de fósforo na produção e nutrição

mineral do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 250-264, 2004.

ARAUJO, F. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SOUZA, M. R. Inoculação do feijão caupi com rizobactérias promotoras do crescimento e desempenho na produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, p.53-58, 2012.

AUNG, T. T.; TITABUTR, P.; BOONKER, N.; HERRIDGE, D.; TEAUMROONG, N. Coinoculation effects of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum sp.* on competitive nodulation and rhizosphere eubacterial community structures of soybean under rhizobia-established soil conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2850-2862, 2013.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R. S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 922-928, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. **Técnica alternativa: coinoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento e produtividade**. [S. l.: s.n.] 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculação/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculação/index.htm)>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e coinoculação. In: **Colloquium Agrariae**, p. 1-7, 2009.

BARBER, S. A. **Soil nutrient bioavailability a mechanistic approach**. New York: John Wiley e Sons, 398p. 1984.

BARBOSA, C. K. R.; REIS, J. N.; BRIGANTE, G. P.; JUNIOR, K. S. F. Adubação nitrogenada, inoculação e coinoculação na cultura do feijoeiro-comum. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 01–06, 2020. e-ISSN: 2447-6218/ ISSN: 1984-6738.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59, 2008.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. (Ed.) **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. New York: CRC Press, 2006.

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

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BREDA, F. A. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2016.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 206-215, 2011.

BULL, L. T. Nutrição Mineral do Milho. In: Bull LT& Cantarella H, (eds). **Cultura do Milho: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, POTAFOS. p. 63-145. 1993.

CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova Economia**, v. 22, n. 1, p. 141-164, jan./abr., 2012. DOI: 10.1590/S0103-63512012000100005.

CAMPOS, A. X. **Fertilização com sulfato de amônio na cultura do milho em um solo do cerrado de Brasília sob pastagem de Brachiaria decumbens**. 2004. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia/Solos e nutrição de plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

CHEKANAI, V.; CHIKOWO, R.; VANLAUWE, B. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across variable soils in Zimbabwe. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 266, p.167-173, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.010>.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 5, p. 83-91, 1995.

CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, p.1641-1649, 2015.

CIVARDI E. A.; SILVEIRA NETO A. N.; RAGAGNIN V. A.; GODOY E. R.; BROD, E. Ureia de liberação lenta aplicada superficialmente e ureia comum incorporada ao solo no rendimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 41: 52-59, 2011.

COELHO, M. R. F.; BERGER, R. Competitividade das exportações brasileiras de móveis no mercado internacional: uma análise segundo a visão desempenho. **Revista FAE**, v. 7, n. 1, p 1-65, jan./jun. 2004.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Quarto levantamento, janeiro 2020. Brasília, DF, v.7, Conab, 2020. 104p.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. V.8 – SAFRA 2020/21- N.4 – Quarto levantamento- janeiro de 2021. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2021.

COOPERTRADIÇÃO – Conhecendo a Fenologia do Feijoeiro e Seus Aspectos Fitotécnicos. Brasília, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173690/1/CNPAF-2018-lvfeijoeiro.pdf>> Acesso em 03 Mar 2021.

CORDEIRO, J. E. B. **Desempenho Agrônomo do Milho em Resposta à Inoculação de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas**. Minas Gerais: UFV, 2017. 95 p. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-Graduação com Área de Concentração em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, Universidade Federal Viçosa, Florestal, 2017.

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense* plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: **Asociación Argentina de Microbiología**, p. 87-95, 2008.

CREWS, T. E.; BROCKWELL, J.; PEOPLES, M. B. Host-rhizobia interaction for effective inoculation: evaluation of the potential use of the ureide assay to monitor the symbiotic performance of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1223-1228, 2004.

CRUZ, J. C.; MONTEIRO, J. A.; SANTANA, D. P.; GARCIA, J. C.; BAHIA, F. G. F. T. C.; SANS, L. M. A.; PEREIRA FILHO, I. A. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 204 p.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DARDANELLI, M. S.; CÓRDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DÍAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* co-inoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 11, p. 2713-2721, 2008.

DARTORA, J.; DENIMARINI, D.; GONÇALVES, E. D. V.; GUIMARÃES, V. F. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2016.

DALL'AGNOL, R. F., RIBEIRO, R. A., ORMENO-ORRILLO, E., ROGEL, M. A., DELAMUTA, J. R. M., ANDRADE, D. S., MARTÍNEZ-ROMERO, E., HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp. A symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63(11), 4167-4173, 2013. doi: 10.1099/ ijs.0.052928-0.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. OKON, Y., ed. **Azospirillum plant associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.57-75.

DENARDIN, N. D. **Seleção de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tolerantes a fatores de acidez e resistentes a antibióticos**. 1991. 89 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1991.

DE OLIVEIRA, L. R.; MIRANDA, G. V.; DE LIMA, R. O.; FRITSCHÉ-NETO, R.; GALVÃO, J. C. C. Eficiência na absorção e utilização de nitrogênio e atividade enzimática em genótipos de milho. **Ciencias Agronômicas**, v. 44, p. 614–621, 2013.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 645-651, 1996.

DO VALE, J. C.; FRITSCHÉ-NETO, R.; BERMUDEZ, F.; MIRANDA, G. V. Efeitos gênicos de caracteres associados à eficiência no uso de nitrogênio em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 385-392, 2012.

DOBBELAERE, S. C. A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J. D. P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLE ROMELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 871- 879, 2001.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Can J Microbiol** 22: p.1464-1473, 1976.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON W. E., NYMAM, C. J. N. (Ed.). **Proceedings of the Institute International Symposium on Nitrogen Fixation**. Washington: Pulman, Washington State University of Press. p. 518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Science Tech, **Springer Verlag**, Madison, USA, p. 1-155. 1987. (Brock/Springer series in contemporary bioscience.

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 1-2, p. 261-272, 2004.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1). Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/milho\\_6\\_ed/economia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/milho_6_ed/economia.htm) . Acesso em: 03 fev. 2021.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Rev. Bras. Ciência do Solo**, 32: 161-171, 2008.

EL-SHINNAWIL, M.; EL-BELTAGY, A.; GHAZAL, F.; HANFY, W. M.; SALEM, G. S. Colonization of wheat roots (*Triticum aestivum* L.) by  $\text{N}_2$ -fixing. **Cyanobact. J. Arid Land Stud.** 26:161-165, 2016.

EMBRAPA, E. B. D. P. A. Sistemas de Produção Embrapa: Cultivo do Milho. 2015. ISSN 1679-012X. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistema\\_sdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=7905&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=8658](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema_sdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7905&p_r_p_-996514994_topicold=8658)>. Acesso em: 09 fev 2021.

FACHINELLI, R.; CECCON, G. Coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na soja em sucessão ao milho safrinha em solo arenoso e argiloso. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 9, n. 2, p. 99-108, 2020.

FANCELLI, A. L. **A cultura do feijão irrigado**. Piracicaba: FEALQ; ESALQ, Departamento de Agricultura, 1990. p. 1-24: Aspectos básicos de fisiologia do feijoeiro.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistical Yearbook - World Food and Agriculture 2013. Acesso em <http://www.fao.org/3/i3107e/i3107e.pdf>.

FARIA, L. C.; MELO, P. G. S.; PEREIRA, H. S.; WENDLAND, A.; BORGES, S. F.; PEREIRA FILHO, I. A. P.; DIAZ, J. L. C.; CALGARO, M.; MELO, L. C. Genetic progress during 22 years of black bean improvement. **Euphytica** 199: 261–272, 2014.

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

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos – Agricultura**. 2006. Disponível em: <[http://engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycyne\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://engormix.com/co_inoculacion_soja_glycyne_s_articulos_800_AGR.htm)>. Acesso: 15 janeiro 2020.

FERREIRA, E. P. B.; CARVALHO, T. C. B.; KNUPP, A. M.; WENDLAND, A.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C. Fixação biológica de nitrogênio em germoplasma

silvestre de feijoeiro comum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Anais...** Búzios: SBMP, 2011. p. 1-4.

FIGUEIREDO, M. A. **Inoculação com *Rhizobium* spp. e adubações nitrogenada e molíbdica no feijoeiro-comum.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2012.

FLEMING, H., HASELKORN, R. 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: nitrogenase is synthesized in heterocysts. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 70, p. 2727-2731, 1973.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho.** Jaboticabal: Funep, 2007. 576p.

FRANK, B. Ueber die peilzsymbiose der leguminosen. **Ber Deut. Bot. Ges.** v. 37, p.376-387, 1889.

FREITAS, R. E.; SANTOS, G. R. dos. Desafios do financiamento agropecuário: o complexo produtivo soja/milho-aves. **Radar**, n. 47, p. 39-48, 2016.

FURUYA, S.; UMEMIYA, Y. The influence of chemical forms on foliar nitrogen absorption of peach trees. **Acta Horticulturae**, v. 594, p. 97-103, 2002.

GALLOWAY, J. N.; ABER, J. D.; ERISMAN, J. W.; SEITZINGER, S. P.; HOWARTH, R. W.; COWLING, E. B.; COSBY, B. J. The nitrogen cascade. **Bio Science**, 53, 341p. 2003.

GAMBOA, J.; PEREZ, G.; BLASCO, M. Um modelo para describir los procesos de retención y lixiviación em los suelos. **Turrialba**, 21: 312-316, 1971.

GAVILANES, F. Z.; ANDRADE, D. S.; ZUCARELI, C.; HORÁCIO, E. H.; YUNES, J. S.; BARBOSA, A. P.; ALVES, L. A. R.; CRUZATTY, L. G.; NAGA RAJU MADDELA, N. R.; GUIMARÃES, M. F. Co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* increases grain yield of maize hybrids. **Rhizosphere**, v. 15:100224, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph>.

GEPTS, P.; FERNÁNDEZ, F. **Etapas de desarrollo de la planta de frijol comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** Cali, Colombia, CIAT, 1982. 10p. (mimeografado).

GOMES, R. F.; SILVA, A. G.; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 31, n. 5, 2007.

GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; FERREIRA, P. D. S. (Ed). **Alimentos para gado de leite:** FEPMVZ, 2009. 568p. (p. 240-269).

GOULDING, K.; JARVIS, S.; WHITMORE, A. Optimizing nutrient management for farm systems. **Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.** 363: 667–680. 2008.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New

insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 39, n. 4, p. 867-876, 2007.

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

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 66-76, 2005.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: Towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **J. Exp. Bot.**, 58: 2369-2387, 2007.

HOEFT, R. G. Desafios para obtenção de altas produtividades de milho e soja nos EUA. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, v. 104, n. 1, p. 1-4, 2003.

HORÁCIO E. H.; ZUCARELI, C.; GAVILANES, F. Z.; YUNES, J. S.; DOS SANTOS SANZOVO, A. W.; ANDRADE, D. S. Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, 41: 2015-2028, 2020.

HUNGRIA, M. BOHER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of soils**, v.31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Weigang, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Embrapa Soja. Circular Técnica, 35. Londrina, p.48, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516- 781X; N 283).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2012.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to

improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015.

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

JARAK, M.; MRKOVAČKI, N., BJELIĆ, D.; JOŠIĆ, D.; HAJNAL-JAFARI, T.; STAMENOV, D. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6 (27), p. 5683-5690, 2012. DOI: 10.5897/AJMR12.759.

JADHAV, S.; TALEKAR, S. Growth of soybean [*Glycine Max* L. (Merr)] under the influence of blue green algal (BGA) biofertilizer. **BIOINFOLET. A Q J Life Sci**, 17:87–89, 2020.

JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. Efeitos do nitrogênio sobre o milho cultivado em consórcio com *Brachiaria brizantha*. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 27, p. 39-46, 2005.

JING, M. A.; QICHENG, B.; XIAOJIE, W.; GANG, L.; CADISCH, G.; XINGWU, L., JIANGUO, Z.; XIAOLI, S.; ZUBIN, X. Paddy system with a hybrid rice enhances cyanobacteria *Nostoc* and increases N<sub>2</sub> fixation. **Pedosphere**, 29:374-387, 2019.

KOMÁREK J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. **Algae** 21:349-375, 2006.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A.; GOLDEN, J. W. Cyanobacterial Heterocysts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2: a000315. 2010.

LANGE, A.; CARVALHO, J. L. N.; DAMIN, V.; CRUZ, J. C.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J. Doses de nitrogênio e de palha em sistema plantio direto de milho no cerrado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 306, p.171-178, 2006.

LARA CABEZAS, W. A. R.; ALVES, B. J. R.; CABALLERO, S. S. U.; SANTANA, D. G. Influência da cultura antecessora e da adubação nitrogenada na produtividade de milho em sistema de plantio direto e solo preparado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1005- 1013, 2004.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e. (Org.). *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Guaíba: **Agrolivros**, v. 1, p. 211-232, 2008.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press. 3rd. ed. 614 p. 1999.

LEMOES, J. M.; GUIMARÃES, V. F.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; SANTOS, M. F. dos; OFFEMANN, L. C. Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com

*Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 189-198, 2013.

LIMA, A. S. T.; BARRETO, M. C. S.; ARAÚJO, J. M.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 713-721, 2011.

LOPES, E. S. Fixação Biológica do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta. In: NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2, 2006, Piracicaba, Brasil. **Anais do Simpósio**, v.1, p.43-67. 2006.

LOPES, V. R. **Melhoramento genético de cana-de açúcar em associação com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. 2013. 133 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

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

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

MAR, G. D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES; M. C.; NOVELINO, J. O. Produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 267-274, 2003.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para a agricultura sustentável, **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S.; SANTOS, O. J. P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. Disponível em:< [http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br).> Acesso em: 04 de fevereiro de 2021.

MATOSO, S. C. G.; KUSDRA, J. F. Nodulação e crescimento do feijoeiro em reposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 567-573, jun. 2014.

MAR, G. D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; NOVELINO, J. O. Produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 267-74, 2003.

MEEKS, J. C., CAMPBELL, E. L. SUMMERS, M. L., WONG, F. C. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Arch. Microbiol**, 178. p. 395-403, 2002.

MEIRA, F.A. Fontes e Épocas de Aplicação do Nitrogênio na Cultura do Milho Irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 2, p. 275-284, 2009.

MELNICK, R. L.; ZIDACK, N.K.; BAILEY, B. A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus spp.* From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v. 46, p. 46-56, 2008.

MENDES, M. C.; ROSÁRIO, J. G. do; FARIA, M. V.; ZOCHE, J. C.; WALTER, A. L. B. Avaliação da eficiência agrônômica de *Azospirillum brasilense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade da farinha. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 4, n. 3, p. 95 110, set./dez. 2011.

MEZIADI, C.; RICHARD, M. M. S.; DERQUENNES, A.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; GRATIAS, A.; PFLIEGER, S.; GEFFROY, V. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, 242: 351-357 2016.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. Ed. Lavras: Ed. Da Ufla, 729p. 2006.

MOREIRA, F.M.S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 2 p. 74-99, 2010.

MOTA, M. R., SANGOI, L., SCHENATTO, D. E., GIORDANI, W., BONIATTI, C.M., DALL'IGNA, L. Fontes estabilizadas de nitrogênio como alternativa para aumentar o rendimento de grãos e a eficiência de uso do nitrogênio pelo milho. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, 39: 512–522 2015.

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, SIQUEIRA, J, O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras, p.459-542, 2006.

MOREIRA, G. B. L.; PEGORARO, R. F.; VIEIRA, N. M. B.; IRAN BORGES, I.; KONDO, M. K. Desempenho agrônômico do feijoeiro com doses de nitrogênio em semeadura e cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 8, Campina Grande, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000800003>.

MÜLLER, T. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* associada à níveis crescentes de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

MUZILLI, O.; OLIVEIRA, E. L.; CALEGARI, A. **Adubação do milho**. Campinas: Fundação Cargill/IAPAR, 1989. 29 p. (Fundação Cargill. Série Técnica, 4).

NAGARAJAN, M.; MARUTHANAYAGAM, V.; SUNDARARAMAN, M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology**, 32: 153-185, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p.1591- 1601,1994.

OKUMURA, R. S., MARIANO, D. D. C., ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Rev. Bras. Tecnol. Apl. nas Ciências Agrárias**, v. 4, p. 226-244, 2012.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I.; **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Documentos, 161).

PACHECO, R. S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Differences in contribution of biological nitrogen fixation to yield performance of common bean cultivars as assessed by the <sup>15</sup>N natural abundance technique. **Plant Soil**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04654-6>.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA/CNPMS, p.1-6, 2006. (Circular Técnica, 75).

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

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEREIRA, J. C. R.; RODRIGUES, R. A. F.; ARF, O.; ALVAREZ, A. C. C. Influência do manejo do solo, lâminas de água e doses de nitrogênio na produtividade do feijoeiro. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 13-19, 2004.

PETRY, N.; BOY, E; WIRTH, J. P.; HURREL, R. F. The potential of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Vehicle for Iron Biofortification. **Nutrients**, v. 7, p. 1144-1173, 2015.

PICHARDO, S.; PFLUGMACHER, S. Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. **Environ. Toxicol.**, 26:300–306, 2011.

PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina**, 4:27-280. 1991.

PORTES, T. A.; KLUTHCOUSKI, J.; OLIVEIRA, P. **Aspectos fenológicos do feijoeiro comum como ferramenta para tomada de decisões fitotécnicas**. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. p. 47-63.

PRADO, A. M. et al. Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná. Embrapa, Circular Técnica, n. 156, 2019. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1117312/1/Circtec156.pdf>. Acesso em: 07/02/2021.

PRASANNA, R. et al. Cyanobacteria-PGPR interactions for effective nutrient and pest management strategies in agriculture. In: SATYANARAYANA, T.; JOHRI, B.N.; PRAKASH, A. (Ed.). **Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology**. Dordrecht: Springer, p. 173–195. 2012.

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

van RAIJ, B.; CANTARELLA, H. Cereais: Milho para grãos e silagem. **Boletim Técnico Instituto Agrônomo de Campinas**, n. 100, p. 56-59, 1997.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 3, p. 227-247, 2000.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139–1146, 2008.

RENWICK, A. R.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 524-532, 1991.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, set./dez. 2013.

RIBEIRO, F. E.; DEL PELOSO, M. J.; BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O.; OLIVEIRA, L. F. C. de. Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) nas regiões norte e nordeste do Brasil. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2011. (Comunicado técnico, 89).

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. São Paulo. \_ Ed. Artmed, 2010. 280 p.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; PINTO JUNIOR, A. S.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetal. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, jan. 2014.

ROGERI, D. A. **Suprimento e perdas de N no solo decorrentes da adição da cama de aves**. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages: UDESC. 2010.

ROSOLEM, C. A.; MACHADO, J. R.; BRINHOLI, O. Efeito de adubação nitrogenada, fosfatada e potássica no sorgo sacarino em um Latossolo Roxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 6, p. 635-641, 1985.

SANDH, G.; EL-SHEHAWY, R.; DIEZ, B.; BERGMAN, B. Temporal separation of cell division and diazotrophy in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. **FEMS Microbiol Lett**, v. 295: 281-288. 2009.

SANTANA, I. O.; SANTOS, M. S.; DOS SANTOS, C. A. P.; CAMPOS, N. M. Produção de feijão-de-corda sob diferentes doses de nitrogênio aliado à aplicação de boro. **Agropecuária Científica no Semiárido Centro de Saúde e Tecnologia Rural**. Patos PB, v. 16, n. 2, p. 75-80, 2020, ISSN: 1808-6845. DOI: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v16i2.1228>.

SANTI, C.; BOGUS, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, p.743–767, 2013.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p. 55-81.

SHARIATMADARI, Z., RIAHI, H., HASHTROUDI, M. S., GHASSEMPOUR, A.; AGHASHARIATMADARY, Z. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran, **Soil Science and Plant Nutrition**, 59:4, p. 535-547, 2013, DOI: 10.1080/00380768.2013.782253

SAVARY, S., FICKE, A., HOLLIER, C. A. **Impacts of global change on crop production and food security**. *Global Environmental Change* 1: 379-387, (2014).

SAWAZAKI, E. **A cultura do milho-pipoca no Brasil**. *O Agrônomo* 53: p. 11–13 2001.

SHI, P. M.; WU, D.; LATIFI, A.; AXEM, S. D.; FEWER, D. P.; TAILA, E.; CALTEAU, A.; CAI, F.; TANDEAU DE MARSAC, N.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; SIVONEN, K.; COURSIN, T.; LAURENT, T.; GOODWIN, L.; NOLAN, M.; DAVENPORT, K. W.; HAN, C. S.; RUBIN, E. M.; EISEN, J. A.; WOYKET, T.; GUGGER, M.; KERFELD, C. A. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA**, Washington, v. 110, p. 1053-1058, 2013.

SCHOSSLER, J. H.; MEERT, L.; RIZZARDI, D. A.; MICHALOVICZ, L. Componentes de rendimento e produtividade do feijoeiro comum submetido à inoculação e coinoculação com estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria**. 17: 10-15, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v17i1.47409>.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JUNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. J.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 2, p. 261-268, 2012.

SILVA, T. R. B.; LEMOS, L. B.; CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade e características tecnológicas de cultivares de feijão em resposta à calagem superficial em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 196-205, 2011.

SILVA, M. F.; SANTOS, C. E. R. S.; SOUSA, C. A.; ARAÚJO, R. S. L.; STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Nodulação e eficiência da fixação do N<sub>2</sub> em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1418-1425, 2012.

SIMS, A. L.; SCHEPERS, J. S.; OLSON, R. A.; POWER, J. F. Irrigated corn yield and nitrogen accumulation response in a comparison of no-tillage and conventional till: tillage and surface-residues variables. **Agronomy Journal**, Madison, v. 90, n. 5, p. 630-637, 1998.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG) (II): feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30: 803-811, 2006.

SORATTO R. P., PEREIRA M., COSTA T. A. M., LAMPERT V. N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Revista Ciência Agrônômica**, 41: 511-518 2010.

SOUZA, L. P. F.; PAULA, M. T.; VELOSO, C. A. C.; CARVALHO, E. J. M.; SILVA, A. R.; PONTES, A. N.; SOUZA, M. J. R.; URBINATI, C. V.; NUNES, H. C. B.; SIMÕES, P. H. O. Evaluation of nitrogen fertilization for planting corn in a yellow latosol under no-tillage system. **Australian Journal of Crop Science**, 14(11):1838-1843, p.2891, 2020. doi: 10.21475/ajcs.20.14.11.

SPARKS, J. P.; MONSON, R. K.; SPARKS, K. L.; LERDAU, M. Leaf uptake of nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) in a tropical wet forest: implications for tropospheric chemistry. **O Ecology**, v. 127, p. 214-221, 2001.

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

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

STEINER, F.; FERREIRA, H. C. P.; ZUFFO, A. M. Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 1, p. 81-98, 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n1p81.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 954 p. 2013.

TEIXEIRA, F. F. et al. Diversidade no Germoplasma de Milho Coletado na Região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 59-67, 2002.

TOEPEL, J.; MCDERMOTT, J. E.; SUMMERFIELD, T. C. & SHERMAN, L. A. Transcriptional analysis of the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 grown under short day/night cycles. **Journal of Phycology**, v. 45: 610-620, 2009.

TOZLU, E. et al. Effect of some plant growth promoting bacteria on yield components of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Aras 98). **Journal of the Agricultural Faculty**, Fukuoka, v. 43, n. 2, p. 101-106, 2012.

USDA, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, Supply and distribution (PSD) on line**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index>>. Acesso em: 15 jan 2021.

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

VIANA, T. O.; VIEIRA, N. M. B.; MOREIRA, G. B. L.; BATISTA, R. O.; CARVALHO, S. J. P.; RODRIGUES, H. F. F. Adubação do feijoeiro cultivado no norte de Minas Gerais com nitrogênio e fósforo. **Revista Ceres**, v.58, p.115-120, 2011.

VIEIRA, R. F.; PAULA JUNIOR, T. J.; CARNEIRO, J. E. S.; QUEIROZ, M. V. Genotypic variability in seed accumulation of foliar-applied molybdenum to common bean. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 38, n. 1, p. 205-213, jan./fev. 2014.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **Introduction to the Cyanobacteria. in: The Ecology of Cyanobacteria**. Ed: Brian A. Whitton and Malcolm Potts. Kluwer Academic Publishers. 1- 11, 2000.

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

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Molecular Biology**. v. 52, p. 659-688, 2001.

WU, Y., LIU, W., LI, X., LI, M., ZHANG, D., HAO, Z., WENG, J. Low nitrogen stress tolerance and nitrogen agronomic efficiency among maize inbreds: comparison of multiple indices and evaluation of genetic variation. **Euphytica**, 180:281–290, 2011.

YADEGARI, M.; RAHMANI, H. A.; NOORMOHAMMADI, G.; AYNEBAND, A. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, p. 1733-1743, 2010.

YOKOYAMA, L. P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos sócio econômicos da cultura. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafós, p.1-21, 1996.

ZEFFA, D. M.; FANTIN, L. H.; KOLTUN, A.; DE OLIVEIRA, A. L.; NUNES, M. P.; CANTERI, M. G.; GONÇALVES, L. S. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. **Peer J**. 8:e7905, 2020.

### 3. ARTIGO 1. Coinoculação de *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima* e *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura no desempenho produtivo de milho (*Zea mays* L.)

#### 3.1 Resumo

O uso de cianobactérias combinadas com *Azospirillum* pode se tornar uma nova estratégia biotecnológica, ecologicamente e economicamente sustentável para o setor agrícola. O objetivo do trabalho foi o de avaliar o efeito da coinoculação de *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima* e *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura no desenvolvimento e desempenho produtivo do milho tipo variedade. O experimento foi conduzido durante duas safras agrícolas, no campo experimental do Instituto de Desenvolvimento Rural-IAPAR, em Londrina (PR). Utilizou-se o delineamento de parcelas subdivididas em esquema fatorial 8x4, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas pela testemunha (sem inoculação), inoculação isolada e combinada de *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevissima* nas sementes, e as subparcelas foram constituídas por quatro doses de nitrogênio em cobertura (0, 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup>). Foram avaliados a altura de planta, altura de inserção de espiga, diâmetro de colmo, área foliar, teores de N, P e K foliar, prolificidade, número de grãos por espiga, massa de mil grãos, produtividade e teor de proteína bruta nos grãos. A coinoculação de *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* + 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura favoreceu o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho, com incrementos de 1647; 2284 e 1625 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respectivamente, quando comparado ao tratamento não adubado e não inoculado, na safra de 2017/2018. Na safra de 2018/2019 não foram observados ganhos de produtividade do milho devido à inoculação com os microrganismos em associação as doses de N em cobertura. A associação das cianobactérias com *A. brasilense* no milho com aplicação de N em cobertura demonstrou ser uma prática agrônômica eficiente para a cultura, resultando em incremento no rendimento de grãos comparativamente às plantas não inoculadas e não adubadas, principalmente na safra de 2017/2018.

**Palavras Chave:** *Zea mays* L., cianobactérias, bactérias diazotróficas, produtividade. Bactérias promotoras de crescimento vegetal, adubação nitrogenada.

#### 3.2 Abstract

The use of cyanobacteria combined with *Azospirillum* may become a new biotechnological, ecologically, and economically sustainable strategy for the agricultural sector. The objective of this work was to evaluate the effect of the co-inoculation of *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevissima*, and *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen rates at topdressing in the development and productive performance of variety corn. The experiment was carried out in two crop seasons, in the experimental field of the Instituto de Desenvolvimento Rural-IAPAR, in Londrina (PR). The experimental design used was a plot subdivided into an 8x4 factorial scheme, with four replications.

The plots consisted of control (without inoculation), isolated and combined inoculation of *A. brasilense*, *A. cylindrica*, and *C. brevissima* in the seeds, and the subplots consisted of four nitrogen rates at topdressing (0, 25, 50, and 100 kg N ha<sup>-1</sup>). Plant height, ear insertion height, stem diameter, leaf area, leaf N, P, and K content, prolificacy, number of grains per ear, thousand-grain weight, productivity, and crude protein content in the grains were evaluated. Co-inoculation of *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* + 25, 50, and 100 kg N ha<sup>-1</sup> at topdressing favored the development and productive performance of corn, with increments of 1647; 2284 and 1625 kg ha<sup>-1</sup> of grains, respectively, when compared to unfertilized and uninoculated treatment, in the 2017/2018 crop season. In the 2018/2019 crop season, corn productivity gains were not observed due to inoculation with the microorganisms in association with the N rates at topdressing. The association of cyanobacteria with *A. brasilense* in corn with the application of N in cover proved to be an efficient agronomic practice for the crop, resulting in an increase in grain yield compared to uninoculated and unfertilized plants, especially in the 2017/2018 crop season.

**Key words:** *Zea mays* L., cyanobacteria, diazotrophic bacteria, productivity. Plant growth-promoting bacteria, nitrogen fertilization.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais e populares cereais devido ao seu alto valor como alimento estável, bem como sua demanda por alimentos para animais e combustível (ABEBE et al., 2016). É cultivado em todo o território brasileiro, o que faz com que a cultura assuma significativa importância econômica, tanto pelo volume de produção quanto pela extensão da área cultivada, constituindo-se como fonte de renda para o agricultor (CONAB, 2021).

É uma cultura exigente em fertilizantes, principalmente os nitrogenados. Um dos principais fatores limitantes ao rendimento de grãos do milho é o suprimento inadequado do nitrogênio pela planta, pois este nutriente exerce importante função nos processos bioquímicos da mesma (TAIZ e ZEIGER, 2009) por ser constituinte de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e clorofila (SANTOS et al., 2010).

Para obtenção de altos rendimentos de grãos de milho em regiões tropicais, é necessário aplicar doses elevadas de nitrogênio, pois o solo não possui suprimento adequado para atender a demanda dessa cultura (TEIXEIRA FILHO et al., 2014; GALINDO et al., 2016).

Contudo, a dependência excessiva e contínua dos fertilizantes nitrogenados é motivo de grande preocupação, em decorrência dos riscos associados ao uso indiscriminado desse insumo, como a eutrofização do solo e águas subterrâneas e emissão de gases de efeito de estufa (DUNGAIT et al. 2012; MARKS et al. 2013).

Pesquisas têm sido realizadas em busca de alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados, como por exemplo, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), como as do gênero *Azospirillum* (SZILAGYI-ZECCHIN; MARRIEL; SILVA, 2017), que estão associados direta ou indiretamente à fertilização com nitrogênio.

Produtos contendo cepas selecionadas das bactérias diazotróficas da espécie *Azospirillum brasilense* passaram a ser recomendadas para aplicação no milho (HUNGRIA et al., 2010). Sabe-se que essa espécie influencia o crescimento das plantas, o que pode ser atribuído à produção de diferentes reguladores de crescimento (CASSÁN; DIÁZ-ZORITA, 2016). O gênero *Azospirillum* produz a maior quantidade de compostos indólicos do grupo das auxinas entre os diferentes gêneros de bactérias estudados (CASSAN;

VANDELEYDEN; SPAEPEN, 2014), além de contribuir para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (LOPES, 2006). Segundo Fukami et al. (2017), a interação de bactérias do gênero *Azospirillum* com estirpes da espécie *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 em associação com as gramíneas têm demonstrado efeitos positivos na cultura do milho, trigo e arroz.

As cianobactérias são outro grupo de bactérias de promoção de crescimento de plantas (BPCP) que proporcionam benefícios em culturas de interesse econômico. Segundo Durand et al. (2003) e Khan et al. (2009), estas espécies ativam a fotossíntese, melhoram a capacidade de absorção de nutrientes, atuam na floração diminuindo o número de abortos florais, possuem diferentes reguladores de crescimento como auxinas, citocininas, giberelinas e betaínas, fornecem macronutrientes como Ca, K e P, e os micronutrientes Fe, Cu, Zn, B, Mn, Co e Mo, às plantas. Para Andrade; Colozzi Filho (2014), estes microrganismos também melhoram a estabilidade de agregados do solo devido à excreção de polissacarídeos e lipídeos, pois estes contribuem para o aumento da agregação do solo.

A hipótese testada neste estudo foi a de que o milho cultivado em condições de campo pode responder de forma diferente em termos de produtividade sob aplicações crescentes de fertilizante nitrogenado em cobertura em função da associação com espécies bacterianas fixadoras de N. Diante do exposto, objetivou-se avaliar com este trabalho, os efeitos da inoculação e coinoculação de *Azospirillum brasiliense* com *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevíssima*, associadas a doses de N em cobertura, na produtividade do milho tipo variedade durante duas safras agrícolas em Londrina-PR.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Caracterização da área experimental

O estudo consistiu-se de um experimento a campo, conduzido em duas safras agrícolas (2017/2018 e 2018/2019), no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) em um Latossolo Vermelho distroférico, muito argiloso (810 g kg<sup>-1</sup> de argila) de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2018). A área está localizada no município de Londrina (PR), coordenadas geográficas 23°23' S e 51° 11' W, altitude média 566 m e clima, segundo classificação de Köppen, do tipo Cfa - subtropical úmido.

Nas duas safras agrícolas as áreas de cultivo foram ocupadas por sucessão de milho/aveia e manejadas em sistema de plantio direto. Antes da instalação dos experimentos, foi realizada a amostragem de solo, na camada de 0-20 cm, para análise das características químicas, conforme metodologia descrita por Raij et al. (2001), cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Características químicas do solo das áreas experimentais, antes da implantação da cultura, na camada de 0 a 20 cm. Londrina, PR, Safras de 2017/2018 e 2018/2019.

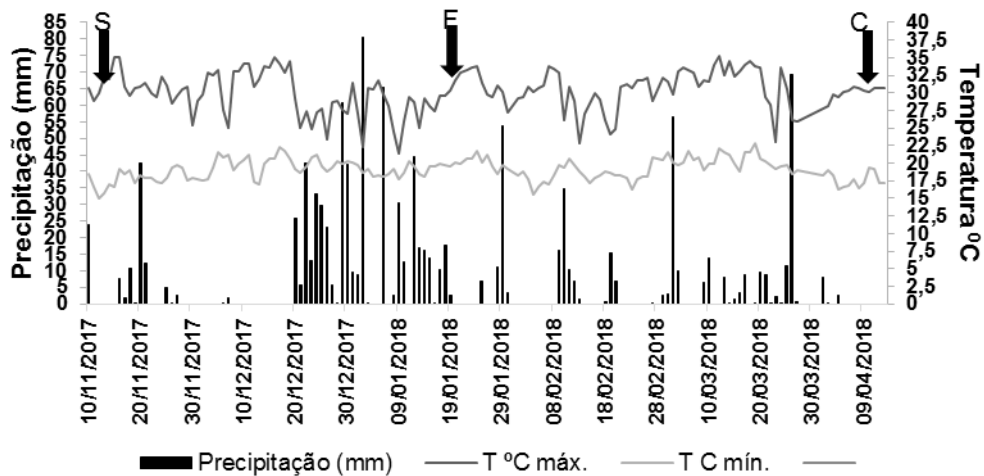
Safra	P (Mehlich-1)	C	pH	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
	mg dm <sup>-3</sup>	g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	-----	-----	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----	-----	(%)
2017/2018	18,0	16,45	5,07	0,49	4,67	2,04	6,07	13,27	54,19
2018/2019	16,8	15,02	4,95	0,54	4,20	1,81	5,48	12,01	54,35

Fonte: Elaboração do próprio autor

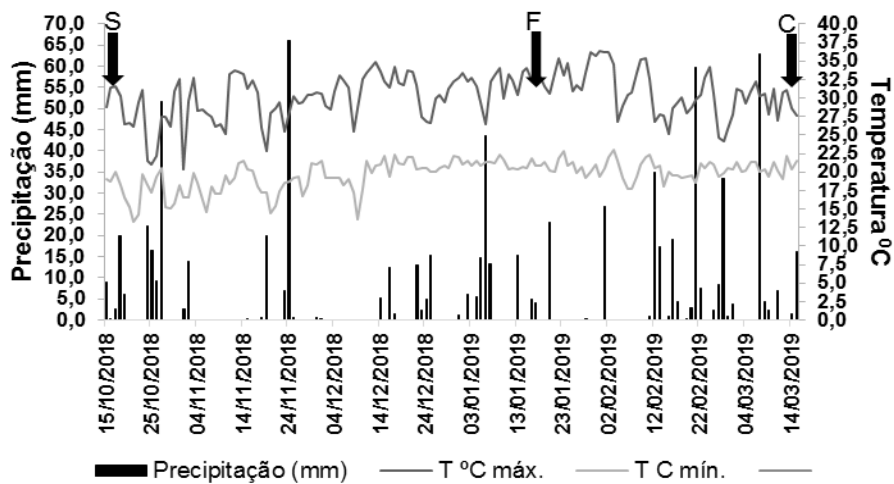
Os dados meteorológicos, registados durante o período de condução dos experimentos, são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Precipitação pluvial e temperaturas máxima e mínima (T máx e T mín) referente aos períodos experimentais (A) Safra 1 (11/2017 a 05/2018) e (B) Safra 2 (11/2018 a 04/2019), Londrina-PR.

(A)



(B)



Onde: S- semeadura, F- floração e C- colheita.

### 3.4.2 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se o delineamento de parcelas subdivididas em esquema fatorial 8x4, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas pela não inoculação, inoculação de *Azospirillum brasilense* (Azo), de *Anabaena cylindrica* (Ana), de *Calothrix brevíssima* (Cal), coinoculação de *A. brasilense* + *A. cylindrica*, de *A. brasilense* + *C. brevíssima*, de *A. cylindrica* + *C. brevíssima* e de *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevíssima*. As subparcelas foram constituídas pelas doses de N aplicadas em cobertura (0, 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup>), com uso de ureia.

As cianobactérias foram obtidas da Coleção do Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande - FURG no Rio Grande (Rio Grande do Sul, Brasil). O

inoculante foi preparado conforme descrito por Gavilanes et al. (2020), para uma concentração aproximada de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Para o *Azospirillum brasilense* usado foi o inoculante comercial NITROBACTER AZP da empresa LABORAGRO (estirpes AbV5 e AbV6 com  $2,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Cada unidade experimental foi constituída por seis linhas de semeadura com seis metros de comprimento, com espaçamento de 0,90 m entre linhas e 0,14 m entre plantas, tendo-se considerado as quatro linhas centrais para avaliações e desprezado 0,5 m nas extremidades, totalizando 13,5 m<sup>2</sup> de área útil.

### 3.4.3 Manejo da cultura do milho

As sementes de milho foram inoculadas à sombra imediatamente antes da semeadura nas doses recomendadas para cada inoculante utilizado. Na inoculação assim como na coinoculação, a dose aplicada para cianobactérias foi de 5 mL para 1 kg de sementes (GAVILANES et al., 2020). Para o *A. brasilense*, foi aplicada a dose de 100 mL para 25 kg de sementes segundo as recomendações do fabricante. A inoculação consistiu em se colocar as sementes e o produto em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea do inoculante.

A cultivar de milho utilizado foi a variedade IPR-164, de ciclo precoce, porte médio de 2,30 m, indicada para cultivo no verão (primeira safra) e safrinha (segunda safra) no estado do Paraná. Os experimentos foram realizados sob sistema de plantio direto, sendo a dessecação da vegetação espontânea feita com o uso do herbicida glifosato 480 g L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i. a.) na dose de 1 a 2,5 L ha<sup>-1</sup>, 15 dias antes da semeadura. A dessecação foi realizada no dia 27 de outubro de 2017 e no dia 30 de setembro de 2018, para a primeira e segunda safra agrícola, respectivamente. Não foi realizada adição de nenhum ingrediente ativo às sementes.

A semeadura do milho, visando população final de plantas de 77.777 plantas por hectare, foi realizada manualmente, em sistema de plantio direto, entre os dias 10 a 13 de novembro de 2017 e dias 15 e 16 de outubro de 2018.

Em todos os tratamentos, foram aplicados no sulco de semeadura 30 kg ha<sup>-1</sup> de N, utilizando a ureia (45% de N). Também, durante a semeadura, juntamente à adubação nitrogenada, foi realizada a adubação básica de 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O com a formulação NPK (0-18-18). Em geral, nos dois anos agrícolas, a emergência das plântulas ocorreu aos sete dias após a semeadura.

A adubação de cobertura foi realizada a lanço, manualmente, aos 35 dias após a emergência (DAE) das plântulas (estádio V6) de acordo com as doses pré-estabelecidas nos tratamentos, utilizando ureia como fonte de nitrogênio (45% de N). Cada unidade experimental recebeu a quantidade de acordo com o seu tratamento.

Para o controle de pragas, em cada experimento, foram realizadas duas aplicações dos inseticidas Tiametoxan + lambda-cialotrina (Engeo Pleno) na dose  $0,2 \text{ L ha}^{-1}$ ; clorantropile (Premio) na dose de  $250 \text{ mL ha}^{-1}$ . O controle de plantas daninhas foi realizado no estágio V3 da cultura do milho utilizando-se mistura de herbicidas Atrazine (Atrazina Nortox 500 SC<sup>®</sup>)-  $1,5 \text{ L ha}^{-1}$  + Tembotriona (Soberan)-  $0,24 \text{ L ha}^{-1}$  adicionado ao adjuvante Áureo ( $0,1 \text{ L } 100 \text{ L}^{-1}$  de água).

A colheita do milho foi realizada manualmente, sendo iniciada a partir do dia 13 de abril de 2018 para a safra de 2017/2018 e, em 15 de março de 2019 para a safra de 2018/2019, aos 150 DAE.

#### **3.4.4 Avaliações fitométricas, componentes de produção e produtividade de grãos na cultura do milho**

Durante o período de desenvolvimento e colheita da cultura, foram mensuradas características morfológicas de plantas, os componentes de produção e produtividade de grãos.

A determinação da altura média de plantas (AP) foi realizada em cinco plantas da área útil por subparcela, 63 dias após emergência (DAE) (no pendoamento do milho- VT), pela mensuração do comprimento do colmo (CC) (da superfície do solo até a base da folha “bandeira”) com auxílio de régua graduada de madeira. Utilizando as mesmas plantas e época de avaliação, a altura de inserção da espiga (AIE) foi obtida pela distância entre a superfície do solo e o ponto de inserção da espiga principal. Simultaneamente foi determinado o diâmetro de colmo (DC) em mm, utilizando as mesmas plantas. Considerou-se o diâmetro do segundo internódio, a partir da base da planta, o qual foi mensurado com uso de paquímetro (KAPPES et al., 2010).

A área foliar (AF) por planta foi avaliada no estágio fenológico do florescimento (R1), em que foi obtida segundo a metodologia de Guimarães et al. (2002), medindo-se o comprimento e largura de todas as folhas fotossinteticamente ativas (mais de 50% da área verde) de cinco plantas por subparcela. Multiplicando-se comprimento x largura x 0,75, obteve-se a área foliar.

A prolificidade (PROL) foi determinada pela contagem do número de espigas colhidas na área útil da parcela, sendo que o número obtido foi dividido pelo número de plantas, obtendo-se assim, o número médio de espiga por planta. Foram consideradas apenas espigas que apresentavam grãos formados.

Para avaliação dos componentes de produção foram coletadas 5 espigas, ao acaso, das linhas centrais da parcela. Determinou-se o número de grãos por espiga (GE), contando-se o número de grãos em cada espiga, determinando-se a média amostral; a massa de mil grãos (MMG), sendo que foram separadas oito repetições de 1000 das sementes por blocos, cujas massas foram determinadas em balança com sensibilidade de centésimos de grama, sendo tais procedimentos efetuados segundo as prescrições estabelecidas pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O valor da massa de grãos obtido foi corrigido para 13% de umidade.

Para a produtividade de grãos (PG), foram colhidas todas as espigas da área útil de cada subparcela, debulhadas e posteriormente foi determinado o seu peso, sendo seu valor corrigido para 13% de umidade, e extrapolado em função da produtividade de espigas para quilograma por hectare.

#### **3.4.5 Análises nutricionais**

Os teores de N, P e K-foliar foram avaliados de acordo com os métodos descritos por Miyazawa (1992), coletadas a folha índice das plantas, 1ª folha considerada fisiologicamente madura, oposta e abaixo à espiga, no estágio R1 (emissão do estilo na espiga). Os teores de macronutrientes foram expressos em g kg<sup>-1</sup>. Para o teor de proteína bruta (PB) foram utilizadas 100 g de grãos por tratamento, livres da presença de insetos, fungos e podridões, de danos mecânicos de qualquer natureza e com umidade uniforme. Os grãos foram moídos em moinho tipo Willey, e a amostra obtida peneirada por uma abertura de malha de 0,42 mm (ABNT 40). Empregou-se o método de Kjeldahl (AOAC, 2000) para determinação de nitrogênio total. O teor de proteína bruta no grão foi calculado utilizando o teor de N multiplicado pelo fator conversão de 6,25 (VILLEGAS et al. 1985). Neste caso, as determinações laboratoriais foram realizadas na matéria seca, utilizando-se três repetições por tratamento.

### **3.4.6 Análise estatística**

Atendido os pressupostos estatísticos, foi realizada análise conjunta dos dados das duas safras de cultivo. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo consideradas normais, não necessitando de transformação. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), sendo a regressão utilizada para a avaliação das doses de nitrogênio, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Ainda, foi calculada a produtividade relativa dos tratamentos em comparação com o tratamento testemunha (não inoculado e não adubado) e adubado com  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$  nas duas safras agrícolas.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação tripla entre os fatores Doses de N vs. Safra agrícola vs. Inoculação para as características avaliadas (Tabelas 2 e 3). Observou-se efeito da interação dupla entre Doses de N vs. Inoculação para o teor de proteína bruta. Verificou-se interação dupla entre Safra agrícola vs. Inoculação para o teor de fósforo, entre Doses de N vs. Safra agrícola para o teor de N foliar (Tabela 2), entre Safra agrícola vs. Inoculação e entre Doses de N vs. Safra agrícola para a produtividade de grãos (PG) (Tabela 3).

Para o fator safra, houve efeito significativo para a altura de planta (AP), altura de inserção da espiga (AIE), área foliar (AF), teor foliar de K (Tabela 2), além da produtividade de grãos (PG) (Tabela 3). Na safra de 2017/2018 os valores médios destas características foram superiores em relação à safra de 2018/2019.

Tabela 2. Valores médios e análise de variância (*p*) para altura de plantas (AP), altura de inserção de espigas (AIE), diâmetro do colmo (DC), área foliar (AF), nitrogênio, fósforo e potássio foliar (N, P, e K) do milho inoculado e coinoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura em 2017/2018 e 2018/2019. Londrina

Causas de Variação	AP	AIE	DC	AF	N	P	K
<b>Quadrado médio</b>	___ (cm)___		(mm)	m <sup>2</sup>		___(g kg <sup>-1</sup> )___	
Blocos (Safra)	752,48	101,52	4,71	0,01	121,81	0,43	114,17
Safra (S)	58167,49*	19611,55*	14,95	0,55*	359,1*	69,66*	2722,17*
Inoculação (I)	389,95*	99,61	7,5	0,02	3,64	0,04	7,14
Nitrogênio (N)	31,42	195,13	1,65	0,03	37,71*	0,11	5,39
S x I	58,45	27,29	8,15	0,01	12,76	0,23*	21,59
N x S	28,76	64,95	3,62	0,012	86,77*	0,12	3,6
N x I	73,28	41,8	1,9	0,013	3,51	0,08	5,01
N x S x I	45,89	46,71	3,05	0,014	2,88	0,04	6,6
Resíduo	47,46	48,82	2,99	0,0093	6,15	0,06	4,04
<b>Safra</b>							
2017/2018	200,58 a	112,42 a	22,33 a	0,92 a	29,05 a	2,56 a	25,96 a
2018/2019	170,43 b	170,43 b	22,81 a	0,83 b	26,68 b	1,52 b	21,45 b
<b>Inoculação</b>							
Controle	182,95 bc	102,17 a	23,48 a	0,86 a	28,42 a	2,05 a	23,11 a
Azo	188,51 ab	106,81 a	22,64 a	0,91 a	27,40 a	2,03 a	23,79 a
Ana	179,99 c	103,34 a	22,56 a	0,86 a	27,68 a	2,03 a	23,93 a
Cal	184,58 abc	102,32 a	22,80 a	0,85 a	28,12 a	2,04 a	23,80 a
Azo + Ana	187,94 ab	104,63 a	21,79 a	0,88 a	28,20 a	2,04 a	23,70 a
Azo + Cal	186,02 abc	106,33 a	22,19 a	0,88 a	27,68 a	1,99 a	23,27 a
Ana + Cal	183,32 abc	102,98 a	22,63 a	0,92 a	27,71 a	2,02 a	23,88 a
Azo + Ana + Cal	190,75 a	104,81 a	22,49 a	0,89 a	27,76 a	2,10 a	24,13 a

**N-Cobertura (kg ha<sup>-1</sup>)**

0	184,99	102,94	22,4	0,87	26,95	1,97	23,71
25	185,13	103,37	22,71	0,84	27,51	2,04	23,96
50	186,53	106,76	22,49	0,9	28,42	2,08	23,47
100	185,37	103,64	22,71	0,89	28,58	2,06	23,67
CV (%)	3,71	6,71	7,66	11,01	8,9	11,79	8,28

Onde: Azo- *A. brasilense*, Ana- *A. cylindrica*, Cal- *C. brevíssima*. Coeficientes de variação em % (CV). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si nas colunas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Valores médios e análise de variância (p) de prolificidade (PROL), número de grãos por espiga (GE), massa de mil grãos (MMG), produtividade de grãos (PG) e proteína bruta (PB) do milho inoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura em 2017/2018 e 2018/2019. Londrina PR.

<b>Causas de Variação</b>	<b>PROL</b>	<b>GE</b>	<b>MMG</b>	<b>PG</b>	<b>PB</b>
<b>Quadrado médio</b>	n <sup>o</sup> .	(g)	(g)	(kg ha <sup>-1</sup> )	(%)
Blocos (Safr)	0,16	928,18	2088,41	14103078	0,93
Safr (S)	0,19	586,91	2032,88	101478273,22*	2,07
Inoculação (I)	0,13	874,16	1207,88	2065645	3,42
Nitrogênio (N)	0,77	1750,18	288,51	3006889	0,11
S x I	0,10	1575,41	459,94	5520470,41*	1,07
N x S	0,35	442,33	284,97	3955050,04*	0,64
N x I	0,13	1408,96	452,81	1300948	2,90*
N x S x I	0,12	853,93	588,85	1281845	0,65
Resíduo	0,12	1257,74	451,25	1223242,68	1,51
<b>Safr (S)</b>					
2017/2018	1,16 a	441,20 a	350,80 a	9346 a	10,43 a
2018/2019	1,10 a	444,22 a	356,40 a	8087 b	10,30 a
<b>Inoculação</b>					
Controle	1,09 a	441,62 a	357,60 a	8520 a	10,57 a
Azo	1,06 a	441,40 a	347,83 a	8460 a	10,49 a
Ana	1,06 a	439,79 a	359,91 a	8383 a	10,43 a
Cal	1,13 a	444,72 a	363,81 a	8713 a	10,71 a
Azo + Ana	1,16 a	446,94 a	349,23 a	8717 a	10,63 a
Azo + Cal	1,22 a	438,83 a	353,13 a	8957 a	10,00 a
Ana + Cal	1,22 a	452,50 a	349,34 a	8876 a	10,10 a
Azo + Ana + Cal	1,09 a	435,85 a	347,81 a	9107 a	9,81 a
<b>N-Cobertura (kg ha<sup>-1</sup>)</b>					
0	1,14	437,26	355,78	8558	10,32
25	1,11	439,27	353,68	8558	10,35
50	1,10	447,98	350,70	9017	10,32
100	1,20	446,29	354,18	8734	10,40
CV (%)	30,94	8,01	6,01	12,69	11,9

Onde: Azo- *A. brasilense*, Ana- *A. cylindrica*, Cal- *C. brevíssima*. Coeficientes de variação em % (CV). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si nas colunas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os experimentos foram conduzidos em duas safras agrícolas e os dados de precipitação pluviométrica total foram de 1116,0 mm (safra de 2017/2018) e de 753 mm (safra de 2018/2019) de acordo com Figura 5A e B. Essas quantidades de precipitações estão além da necessidade do consumo de água da cultura do milho durante o seu ciclo, que para Cruz et al. (2006) está em torno de 600 mm. Na safra agrícola de 2018/2019, a precipitação pluvial diminuiu acentuadamente nas fases V10 (período do rápido crescimento) e VT (pendoamento do milho), fato este que reduziu às características mencionadas como altura de planta (AP), altura de inserção da espiga (AIE), área foliar (AF), teores de N, P e K-foliar e produtividade de grãos (PG), conseqüentemente, pode ter também alterado a resposta às causas de variação estudadas em cada safra.

Segundo Bergonci et al. (2001) e Bergamaschi et al. (2004), a maior exigência de consumo de água ocorre durante o pendoamento e espigamento, quando a planta tem a maior área foliar. Durante o período vegetativo, o déficit hídrico reduz o crescimento do milho, em função de decréscimos da área foliar e da biomassa. Porém, nesse período, ainda não estão sendo formados os componentes do rendimento. Assim, os efeitos sobre a produção de grãos podem ser atenuados posteriormente, principalmente se as condições hídricas se tornarem favoráveis, o que poderá garantir níveis satisfatórios de rendimento de grãos, fato que não ocorreu na safra de 2018/2019. Isso demonstra que os processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das culturas, têm estreita relação e influenciam sobremaneira o produto final. Bergamaschi et al. (2004) observaram redução de 25% e 50% da produtividade quando o déficit hídrico ocorreu na emissão dos estigmas e no florescimento, respectivamente.

Efeito significativo foi verificado em relação à inoculação das sementes de milho apenas para altura de planta (AP). Não houve efeito significativo das doses de N em cobertura para as características avaliadas (Tabelas 2 e 3).

As características fitométricas e o desempenho produtivo do milho não foram influenciados pelo efeito da interação tripla entre doses de N, inoculação de sementes e ano de cultivo (Tabela 2 e 3), demonstrando que as doses de N aplicadas em cobertura não interferiram na ação dos inoculantes, independentemente das safras avaliadas. O efeito da interação entre inoculação de microrganismos e doses de N tem apresentado resultados variados, não estando

ainda consolidado de acordo com a literatura. Gavilanes et al. (2020) avaliando a coinoculação de *A. cylindrica* e *A. brasilense* em genótipos de milho, observaram apenas efeitos significativos isolados para inoculantes e adubação nitrogenada nas diferentes variáveis avaliadas, demonstrando que as doses de N do fertilizante químico fornecidas não interferem no efeito dos microrganismos. Dartora et al. (2013) também não verificaram efeitos significativos da interação entre adubação nitrogenada e inoculação com *A. brasilense* para as características morfoagronômicas na cultura do milho. Por outro lado, Galindo et al. (2016) observaram efeito significativo na interação de doses de N e inoculação, onde o tratamento inoculado com *A. brasilense* associado a 200 kg ha<sup>-1</sup> de N apresentou maior produtividade de grãos de milho.

A coinoculação de *Azo* + *Ana* + *Cal* apresentou média superior de AP (190,75 cm) dentre todos os tratamentos (Tabela 2). A média mais baixa para AP foi observada no tratamento com inoculação isolada de *A. cylindrica*, com 179,99 cm. A explicação do comportamento observado é de que o consórcio de bactérias pode ser mais eficaz para a promoção de crescimento vegetal do que uma única bactéria. Estudo conduzido por Gavilanes et al. (2020) avaliando a coinoculação de *A. cylindrica* e *A. brasilense* em condições de campo, observaram que a coinoculação favoreceu maior crescimento e desenvolvimento das plantas dos genótipos testados, resultados estes que para os autores foi devido ao seu efeito no crescimento do sistema radicular que contribuiu na absorção e utilização de nutrientes. Os mesmos autores relataram ainda que *A. cylindrica* e *A. brasilense* foram as melhores combinações para coinoculação com potencial para seu uso em cultivo de milho, corroborando com os resultados obtidos da presente pesquisa.

A inoculação e a coinoculação de cianobactérias com *A. brasilense* não apresentaram efeito significativo para diâmetro do colmo, índice de área foliar e prolificidade (Tabela 2), permitindo inferir que a eficiência de uma bactéria utilizada como inoculante na forma isolada assim como combinada com outras bactérias irão apresentar resultados positivos, dependendo principalmente do genótipo do hospedeiro. Pandolfo et al. (2015) avaliando o efeito da inoculação das sementes de milho e trigo com *A. brasilense*, também não obtiveram respostas significativas para o diâmetro de colmo e índice de área foliar. Em um trabalho realizado por Bach et al. (2016) onde foi avaliado o controle biológico e competência na promoção de crescimento de bactérias em quatro genótipos de trigo, a inoculação das três

bactérias não foi prejudicial às plantas e, também não promoveram crescimento das plantas de qualquer cultivar de trigo em comparação com o tratamento controle não inoculado.

Os teores de nutrientes foliares são parâmetros muito importantes relacionados à produção da cultura do milho, e quando associadas à inoculação com microrganismos promotores de crescimento de plantas podem ainda ter um efeito ainda mais significativo, uma vez que essas bactérias atuam direta ou indiretamente na nutrição mineral da planta. Na interação entre safra agrícola vs. doses de N em cobertura houve efeito significativo para o teor de N-foliar (Figura 6) e produtividade de grãos (Figura 7) apenas na safra de 2017/2018. Observa-se pela Figura 6, que o teor de N-foliar aumentou com o incremento das doses de N em cobertura, e o maior valor foi obtido na dose máxima utilizada, de 100 kg ha<sup>-1</sup> de N, com 31,36 g kg<sup>-1</sup>, com um incremento de 16% em relação à testemunha (0 kg ha<sup>-1</sup> de N). Para Cantarella et al. (1997), este valor está compreendido na faixa considerada adequada para a cultura que é de 27,0 a 35,0 g kg<sup>-1</sup> de N. O melhor modelo de regressão que se ajustou foi linear ( $P < 0,05$ ), com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 100%. Segundo Nascimento et al. (2012) o aumento da disponibilidade de N, principalmente através da adubação mineral, é acompanhado de resposta positiva dos teores de N na folha, fato observado nesta pesquisa, na safra de 2017/2018 (Figura 6). Nascimento et al. (2012), avaliando diagnose foliar em plantas de milho em sistema de semeadura direta em função de doses e épocas de aplicação de N na cultura do milho, observaram maior valor de N-foliar a partir da dose de 69,1 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura. Já na safra de 2018/2019, foi observada uma média de 27,43 g kg<sup>-1</sup> do teor de N-foliar. Em pesquisa realizada por Galindo et al. (2016), os autores observaram que a inoculação com *Azospirillum* influenciou no aumento dos níveis de N e P em folhas de trigo e milho. De igual modo, a aplicação de cianobactérias contribui para a absorção de macro e micronutrientes, favorecendo comunidades microbianas na rizosfera de híbridos de milho e, conseqüentemente promoveu uma economia significativa de fertilizantes químicos (PRASANNA et al., 2015, 2016).

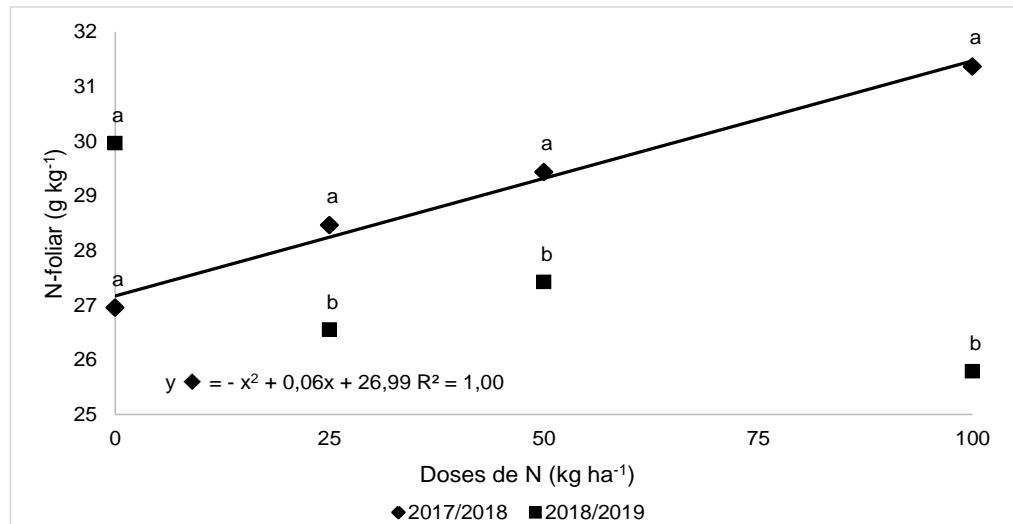


Figura 6. Efeito da interação significativa entre Safra (S) e doses de N em cobertura (N) para o teor de N foliar na cultura do milho em função da inoculação ou coinoculação de *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019. Letras diferentes na vertical diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Comparando as duas safras dentro das doses de N, em função da inoculação ou coinoculação de *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, a safra 2017/2018 apresentou valor superior do teor de N-foliar para as doses de 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> (Figura 6). Para a produtividade de grãos, na safra 2017/2018 observaram-se valores superiores da característica para todas as doses de N utilizadas em cobertura (0, 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>) em relação à safra de 2018/2019 (Figura 7). Estes resultados demonstram um efeito mensurável com a inoculação e coinoculação de cianobactérias e *A. brasilense*, podendo ter havido sucesso na interação com as doses de N utilizadas em cobertura na safra agrícola de 2017/2018, confirmando o importante efeito do genótipo da planta, estirpe bacteriana, quantidade e qualidade das células de BPCP utilizadas como inoculante em diferentes condições edafoclimáticas, como mencionado por Matsumura et al. (2015).

Avaliando as doses de N em cobertura dentro de safra agrícola, para a produtividade de grãos, houve um aumento linear em função do aumento das doses de N aplicadas em cobertura, onde na dose máxima de 100 kg ha<sup>-1</sup> de N obteve-se maior valor de 9704 kg ha<sup>-1</sup> (Figura 7). Na safra de 2018/2019, a média da produtividade foi de 8087 kg ha<sup>-1</sup>, independente da dose de N utilizada em cobertura.

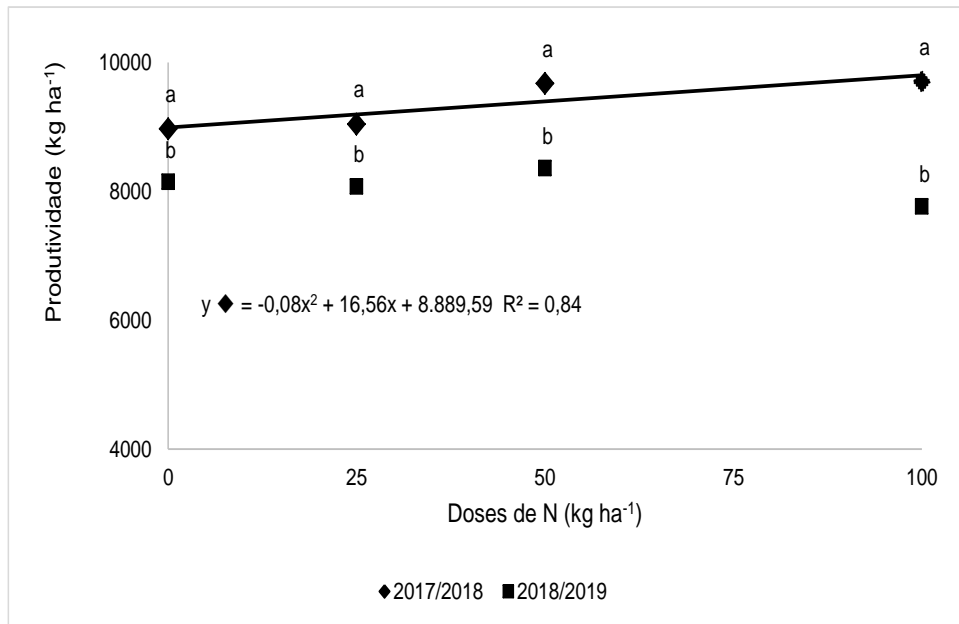


Figura 7. Efeito da interação significativa Safra (S) e doses de N em cobertura (N) para a produtividade do milho inoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevissima*, com quatro doses de nitrogênio em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019. Letras diferentes na vertical diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste deTukey.

Para o teor de P foliar no milho, avaliando a inoculação dentro das duas safras de cultivo observou-se que todos os tratamentos apresentaram valores superiores na safra de 2017/2018 em relação a 2018/2019 (Tabela 4). Avaliando as safras de cultivo dentro da inoculação, não se observou efeito significativo entre os mesmos. Os valores médios obtidos para 2017/2018 e 2018/2019 foram 2,56 e 1,52 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. De acordo com Alves et al. (2009), a absorção de P é semelhante a do N, ocorrendo praticamente paralela ao acúmulo de matéria seca durante a maior parte do desenvolvimento vegetativo da planta, com o ponto de exigência máxima situando-se próximo da época de pendoamento, época esta, em que a safra de 2018/2019 foi caracterizada por clima seco e altas temperaturas (Figura 5B).

Avaliando-se a produtividade de grãos em função da inoculação dentro de safras de cultivo (Tabela 4), verificou-se que os tratamentos que proporcionaram os maiores valores foram o *A. brasilense*, *A. cylindrica*, a associação de Azo + Ana, Ana + Cal, de Ana + Cal, de Azo + Ana + Cal, principalmente em 2017/2018.

Tabela 4. Efeito da interação significativa entre ano (A) e inoculação (I) para teor de fósforo e produtividade do milho inoculado com *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevíssima*, com quatro doses de N em cobertura nas safras agrícolas de 2017/2018 e 2018/2019

Inoculação	P-foliar (g kg <sup>-1</sup> )		Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )	
	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19
Controle	2,54 a A	1,56 b A	8526,88 a B	8512,64 a A
<i>A. brasilense</i>	2,60 a A	1,50 b A	9758,60 a AB	7161,94 b A
<i>A. cylindrica</i>	2,40 a A	1,63 b A	8973,17 a AB	7792,98 b A
<i>C. brevíssima</i>	2,54 a A	1,56 b A	9120,34 a AB	8304,34 a A
<i>A. brasilense</i> + <i>A. cylindrica</i>	2,47 a A	1,61 b A	9228,50 a AB	8206,14 b A
<i>A. brasilense</i> + <i>C. brevíssima</i>	2,57 a A	1,41 b A	9481,95 a AB	8435,20 b A
<i>A. cylindrica</i> + <i>C. brevíssima</i>	2,62 a A	1,41 b A	9409,40 a AB	8342,55 b A
<i>A. brasilense</i> + <i>A. cylindrica</i> + <i>C. brevíssima</i>	2,75 a A	1,50 b A	10272,52 a A	7940,97 b A

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Avaliando as safras de cultivo dentro do fator inoculação, houve apenas efeito significativo na safra de 2017/2018, onde a coinoculação de Azo + Ana + Cal apresentou maior produtividade de grãos, com 10.272,52 kg ha<sup>-1</sup>, em relação ao tratamento controle (Tabela 4). Os demais tratamentos apresentaram valores intermédios, com média de produtividade na safra de 2018/2019 com 8.087,10 kg ha<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstraram o potencial agrícola da *A. cylindrica* e *A. brasilense* na forma isolada ou associada à outros microrganismos, como biofertilizantes nas condições edafoclimáticas avaliadas na presente pesquisa. O efeito da superioridade da coinoculação sobre os demais tratamentos é devido aos efeitos combinados que as duas bactérias proporcionam, sendo que estas bactérias são capazes de promover maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de plantas, promovendo então, melhor absorção de água e nutrientes, podendo ocasionar maior crescimento, desenvolvimento e produtividade. Importa salientar que as cianobactérias têm sido utilizadas para produzir hormônios ou substâncias promotoras do crescimento das plantas para facilitar o crescimento eficaz destas, com destaque positivo para a cultura do milho (SURESH et al., 2019).

Para os teores de proteína bruta (PB) dos grãos de milho não houve efeito significativo das doses de N em cobertura dentro de cada nível de inoculação (Tabela 5). As médias de PB para 0, 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> dentro da inoculação foram estatisticamente iguais, sendo 10,33, 10,42, 10,32 e 10,40 %, respectivamente.

Tabela 5. Efeito da interação significativa entre Inoculação (I) e doses de nitrogênio em cobertura (N) para proteína bruta do milho, para as duas safras de cultivo de cultivo de milho.

Inoculação	N-cobertura (kg ha <sup>-1</sup> )			
	0	25	50	100
Controle	9,96 ab	10,65 a	10,77 a	11,5 a
<i>A. brasilense</i>	10,34 ab	9,85 a	10,68 a	11,08 ab
<i>A. cylindrica</i>	10,92 a	10,62 a	9,74 a	10,44 ab
<i>C. brevíssima</i>	11,04 a	10,34 a	11,15 a	10,30 ab
<i>A. brasilense</i> + <i>A. cylindrica</i>	10,40 ab	10,99 a	10,43 a	10,73 ab
<i>A. brasilense</i> + <i>C. brevíssima</i>	10,67 ab	9,80 a	9,33 a	10,23 ab
<i>A. cylindrica</i> + <i>C. brevíssima</i>	10,40 ab	10,82 a	10,04 a	9,27 b
<i>A. brasilense</i> + <i>A. cylindrica</i> + <i>C. brevíssima</i>	8,87 b	10,26 a	10,41 a	9,67 ab

Letras diferentes na vertical em cada dose de N, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Avaliando a inoculação dentro de cada dose do N em cobertura, foi observado efeito significativo somente nas doses 0 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> (Tabela 5). Quando não foi utilizado o N (0 kg N ha<sup>-1</sup>), a inoculação de *C. brevíssima* apresentou maior valor de proteína bruta superando a coinoculação de Azo + Ana + Cal, com 10,92 e 8,87%, respectivamente. O incremento no teor de proteína bruta proporcionado pela inoculação das sementes com a inoculação de *C. brevíssima* neste estudo, provavelmente esteve associado à FBN propiciada pela cianobactéria, e a consequente importância do N na composição de aminoácidos e de proteínas (MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2011; TAIZ et al., 2013). Resultados similares aos verificados na presente pesquisa foram encontrados por Dotto et al. (2010) que obtiveram respostas positivas relacionadas ao teor de N em grãos de milho quando da inoculação de sementes com *Herbaspirillum* e aplicação de doses de N.

Comparando-se todos os tratamentos, quando aplicou-se 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura no milho, o tratamento não inoculado apresentou o valor superior de PB com 11,5% (Tabela 5). O valor mais baixo foi observado na coinoculação de Ana + Cal, com 9,67%. Basi (2013) verificaram efeitos significativos da adubação nitrogenada em cobertura no teor de proteína em grãos de milho, entretanto, não foram observados efeitos significativos da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*.

Em relação ao incremento da produtividade de grãos, no ano de 2017/2018, todos os tratamentos em comparação com o tratamento testemunha (tratamento sem inoculação e não adubado com N), a inoculação dupla de Azo + Cal + 50 e 100

kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, proporcionaram um aumento na ordem de 1164 e 1673 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de milho (Tabela 6).

Tabela 6. Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de N-cobertura, em relação ao tratamento testemunha, na safra de 2017/2018, Londrina-PR.

Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )							
	0	%	25	%	50	%	100	%
T1	8744 (-)	-	7793 (-950)	-11	8683 (-61)	-1	8888 (144)	2
T2	9888 (1143)	10	9972 (1228)	14	9642 (898)	10	9817 (1073)	12
T3	8743(-1)	0,01	9160 (416)	5	9069 (352)	4	8921 (177)	2
T4	8920 (176)	2	8865 (121)	1	9381 (638)	7	9316 (572)	7
T5	8184 (-560)	-9	8934 (190)	2	9118 (374)	4	10678 (1934)	22
T6	8951 (207)	2	8653 (-91)	1,0	9908 (1164)	13	10417 (1673)	19
T7	9305 (561)	6	8558 (-186)	-2	10553 (1809)	21	9222 (478)	6
T8	9302 (558)	6	10391 (1647)	19	11028 (2284)	26	10369 (1625)	19

Onde: T1- Controle, T2- *A. brasilense*, T3- *A. cylindrica*, T4- *C. brevíssima*, T5- *A. brasilense* + *A. cylindrica*, T6- *A. brasilense* + *C. brevíssima*, T7- *A. cylindrica* + *C. brevíssima* e T8- *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevíssima*.

A inoculação dupla de Azo + Ana + 100 kg N ha<sup>-1</sup> proporcionou um incremento de 1934 kg ha<sup>-1</sup> de grãos em comparação ao tratamento não inoculado e não adubado (Tabela 6). A inoculação tripla de Azo + Ana + Cal + 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura apresentaram um aumento de 1647, 2284 e 1625 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respectivamente, quando comparado tratamento não inoculado e não adubado. Tal comportamento demonstra que a combinação de bactérias apresentou interações positivas entre si com as doses de N utilizadas. Na natureza muitos microrganismos coexistem no ambiente, havendo vários tipos de interações microbianas conhecidas, como antagonismo, competição e simbiose.

Na comparação com o tratamento não inoculado e adubado com 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura a inoculação dupla de Azo + Cal + 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N apresentou ganhos de 1098 e 1529 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de milho (Tabela 7). Por outro lado, a associação de Ana + Cal + 50 kg N ha<sup>-1</sup> proporcionou um acréscimo de 1665 kg ha<sup>-1</sup> de grãos. Na inoculação tripla de Azo + Ana + Cal + 25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> verificaram-se aumentos na ordem de 1504, 2140 e 1482 kg ha<sup>-1</sup> de grãos.

Tabela 7. Incremento de produtividade em kg ha<sup>-1</sup> e em porcentagem do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento sem inoculação e adubado com 100 kg ha<sup>-1</sup> de N-cobertura, na safra de 2017/2018, Londrina-PR

Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )							
	0	%	25	%	50	%	100	%
T1	8744 (-144)	-2	7793 (-1095)	-12	8683 (-205)	-2	8888 (-)	-
T2	9888 (999)	11	9972 (1084)	12	9642 (754)	9	9817 (929)	11
T3	8743 (-145)	-2	9160 (272)	3	9069 (181)	2	8921 (33)	0
T4	8920 (32)	0	8865 (-23)	0	9381 (493)	6	9316 (428)	5
T5	8184 (-704)	-8	8934 (46)	1	9118 (230)	3	10678 (1790)	20
T6	8951 (63)	1	8653 (-235)	-3	9908 (1020)	12	10417 (1529)	17
T7	9305 (417)	5	8558 (-330)	-4	10553 (1665)	19	9222 (334)	4
T8	9302 (414)	5	10391 (1503)	17	11028 (2140)	24	10369 (1482)	17

Onde: T1- Controle, T2- *A. brasilense*, T3- *A. cylindrica*, T4- *C. brevíssima*, T5- *A. brasilense* + *A. cylindrica*, T6- *A. brasilense* + *C. brevíssima*, T7- *A. cylindrica* + *C. brevíssima* e T8- *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevíssima*.

Na safra de 2018/2019, em comparação com tratamento testemunha (tratamento sem inoculação e sem adição de N), o tratamento T7 (inoculação dupla de *A. cylindrica* + *C. brevíssima*) na dose de 50 kg ha<sup>-1</sup> de N apresentou um incremento de 996 kg ha<sup>-1</sup> de grãos (Tabela 8).

Tabela 8. Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento controle, safra de 2018/2019, Londrina-PR.

Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )							
	0	%	25	%	50	%	100	%
T1	8615 (-)	-	8419 (-196)	-2	8385 (-230)	-3	8632 (18)	0
T2	6446 (-2168)	-25	6931 (-1683)	-20	8558 (-56)	-1	6712 (-1902)	-22
T3	7855 (-759)	-9	7926 (-689)	-8	7606 (-1009)	-12	7786 (-829)	-10
T4	8640 (26)	0	8098 (-517)	-6	8630 (16)	1	7853 (-761)	-9
T5	9292 (677)	8	8253 (-361)	-4	7538,7 (-1076)	-13	7741 (-874)	-10
T6	8837 (223)	3	8242 (-328)	-4	8846 (321)	3,7	7816 (-798)	-9
T7	7801 (-814)	-9	8104 (-511)	-6	9611 (996)	12	7855 (-759)	-9
T8	7690 (-925)	-10	8631 (16)	0	7719(-896)	-10	7725 (-890)	-10

Onde: T1- Controle, T2- *A. brasilense*, T3- *A. cylindrica*, T4- *C. brevíssima*, T5- *A. brasilense* + *A. cylindrica*, T6- *A. brasilense* + *C. brevíssima*, T7- *A. cylindrica* + *C. brevíssima* e T8- *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevíssima*.

Na safra de 2018/2019, comparando todos os tratamentos com o tratamento não inoculado e adubado com 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura (Tabela 9), a inoculação dupla de Ana + Cal + 50 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura resultou no aumento de 978 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de milho.

Tabela 9. Incremento de produtividade do milho inoculado com cianobactérias e *A. brasilense* associadas à quatro doses de nitrogênio em cobertura, em relação ao tratamento adubado com 100 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, na safra de 2018/2019, Londrina, PR.

Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )							
	0	%	25	%	50	%	100	%
T1	8615 (-18)	-0,2	8418,7 (-213,7)	-3	8385 (-247)	-3	8632 (-)	-
T2	6446 (-2186)	-25	6931,3 (-1701,1)	-20	8558 (-74)	-1	6712 (-1920)	-22
T3	7855 (-777)	-9	7925,6 (-706,8)	-9	7606 (-1026)	-12	7786 (-847)	-10
T4	8640 (8)	0	8097,5 (-534,9)	-6	8630 (2)	0	7853 (-779)	-9
T5	9292 (659)	8	8253,2 (-379,2)	-4	7539 (-1094)	-13	7741 (-891)	-10
T6	8837 (205)	2	8241,8 (-390,6)	-5	8846 (213)	3	7816 (-816)	-10
T7	7801 (-832)	-10	8103,5 (-528,9)	-6	9611 (978)	11	7855 (-777)	-9
T8	7690 (-943)	-11	8630,5 (-1,9)	-0,002	7719 (-914)	-11	7725 (-908)	-11

Onde: T1- Controle, T2- *A. brasilense*, T3- *A. cylindrica*, T4- *C. brevíssima*, T5- *A. brasilense* + *A. cylindrica*, T6- *A. brasilense* + *C. brevíssima*, T7- *A. cylindrica* + *C. brevíssima* e T8- *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevíssima*.

Díaz-Zorita et al. (2015) que evidenciaram em diversos estudos de campo, principalmente na América Latina e Ásia, um aumento no rendimento de grãos em cereais para a resposta à inoculação com *Azospirillum* sp. com incremento de 10,0% no rendimento de grãos.

Estudos realizados por Gavilanes et al. (2020) avaliando a coinoculação de *A. cylindrica* com *A. brasilense* no rendimento de grãos de híbridos de milho demonstram que a co-inoculação de *A. cylindrica* + *A. brasilense* aumentou a produtividade em 967 kg ha<sup>-1</sup> em Londrina-PR e em 1.744 kg ha<sup>-1</sup> em Faxinal-PR, em comparação ao tratamento controle.

Para Repke et al. (2013), relatam que pesquisas realizadas com a aplicação de *A. brasilense* via solução nas sementes, com ou sem utilização da adubação nitrogenada, não apresentaram efeito significativo no desenvolvimento e produtividade do milho. Sangoi et al. (2015) também relataram que o tratamento das sementes com *Azospirillum* não contribuiu para o aumento da produtividade do milho, independente do sistema de manejo e do nível de N mineral aplicado na cultura. Prasanna et al. (2016), avaliando a produtividade do milho, não encontraram efeitos da inoculação com cianobactérias em relação ao controle. Para Matsumura et al. (2015), a resposta da inoculação pode variar de acordo com o genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a quantidade e qualidade das células de BPCP utilizadas como inoculante.

Resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram benefícios da coinoculação das cianobactérias das espécies *A. cylindrica* e *C. brevíssima* com *A.*

*brasilense* associadas a doses de N em cobertura para a variedade de milho IPR164, destacando-se a safra de 2017/2018, especificamente no incremento da produtividade. Tal fato se deve, provavelmente, por não ter ocorrido déficit hídrico nas fases críticas de desenvolvimento da cultura no período mencionado..

A prática mais conhecida e consolidada na exploração dos benefícios das cianobactérias em culturas em com interesse económico, é a inoculação das mesmas nas culturas do feijão comum (PICHARDO e PFLUGMACHER, 2011), do milho (GAVILANES et al., 2020), do trigo (EL-SHINNAWIL et al. 2016), da soja (JADHAV e TALEKAR, 2020), na cultura do arroz (JING et al. 2019).

A combinação das cianobactérias com outras bactérias fixadoras de N aumentam o fornecimento desse nutriente às plantas (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014) e pode contribuir no aumento da produtividade. Gavilanes et al. (2020) avaliando a coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense* verificaram aumento do rendimento de grãos de híbridos de milho (GAVILANES et al. 2020). Horácio et al. (2020) avaliando a coinoculação de *Rhizobium*, *Azospirillum* e cianobacterias observaram aumento da aumento na produção de grãos de feijão comum. Diante do exposto, torna-se necessário que se realizem mais pesquisas utilizando cianobactérias como inoculante, isoladas ou associadas com BPCPs em cultivares de milho em diferentes ambientes, visando à redução ou substituição de uso de fertilizantes minerais principalmente na agricultura.

### 3.6 CONCLUSÕES

As características avaliadas na cultivar do milho não foram alteradas pela interação entre doses de N em cobertura (0,25, 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup>), safra e inoculação, demonstrando que dependendo da safra, as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias.

A safra de 2017/2018 apresentou maior crescimento e desenvolvimento das plantas de milho quando coinoculadas, contribuindo para aumentos acima de 1000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos nos tratamentos em coinoculação de *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* associadas a 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura com incrementos de 1647; 2284 e 1625 kg de grãos de milho, respectivamente, quando comparado ao tratamento não adubado e não inoculado.

A associação de *A. brasilense* e cianobactérias com as doses de N utilizadas em cobertura mostrou-se prática agrônômica eficiente para o milho em condições tropicais.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE, Z.; DABALA, C.; BIRHANU, T. System Productivity as Influenced by Varieties and Temporal Arrangement of Bean in Maize-climbing Bean Intercropping. **Journal of Agronomy**, vol. 16, n. 1, p. 1–11, 2016.
- ALVES, W. W. A.; DE ALBUQUERQUE, J. H.; DE OLIVEIRA, F. A.; DE AZEVEDO, C. A. V.; NETO, J. D.; Água disponível no solo e adubação fosfatada: efeito sobre o crescimento e desenvolvimento do milho. **Revista Verde**, v. 4, n. 1, p. 47-53. 2009.
- ANDRADE, D.; COLOZZI FILHO, A. Microalgae of continental waters Volume 2: production of biomass and co-products. **Microalgas de águas continentais volume 2: produção de biomassa e coprodutos**, 2014. ISSN 8588184494.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.
- BACH, E.; SANTOS SEGER, G. D.; CARVALHO FERNANDES, G.; LISBOA, B. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promotion bacteria, **Applied Soil Ecology**, 99, p. 141-149. 2016.
- BASI S.; **Associação de *Azospirillum brasilense* e de Nitrogênio em cobertura na cultura de Milho**; Dissertação (Mestrado), Área de Concentração em Produção Vegetal; Guarapuava, 2013.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C.A.M.; MÜLLER, A.G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 831-839, 2004.
- BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A. O.; FRANÇA, S.; RADIN, B. Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 949-956, 2001.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, p. 399, 2009. ISSN 978-85-99851-70-8.
- CANTARELLA, H.; RAIJ, B. Van.; CAMARGO, C. E. O. Cereais. In: RAIJ, B. Van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Eds.). **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 45-71 (Boletim técnico, 100).
- CASSAN, F.; VANDELEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria PGPR belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, 33:440-459, 2014.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, 10 2014.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. V.8 – SAFRA 2020/21- N.4 – Quarto levantamento- janeiro de 2021. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2021.

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

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

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n.3, p. 376-382, 2010.

DUNGAIT, J. A.; CARDENAS, L. M.; BLACKWELL, M. S. A.; WU, L.; WITHERS, P. J. A.; CHADWICK, D. R.; BOL, R.; MURRAY, P. J.; MACDONALD, A. J.; WHITMORE, A. P.; GOULDING, K. W. T. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. *Science of the Total Environment*, 434, 39-50, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.029>.

DURAND, N.; BRIAND, X.; MEYER, C. The effect of marine bioactive substances (NPRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, London, v. 119, n. 4, p. 489-493, 2003.

EL-SHINNAWIL, M.; EL-BELTAGY, A.; GHAZAL, F.; HANFY, W. M.; SALEM, G. S. Colonization of wheat roots (*Triticum aestivum* L.) by N<sub>2</sub>-fixing. **Cyanobact. J. Arid Land Stud.** 26: 161–165. 2016.

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

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

GAVILANES, ZAMBRANO, F. Z.; ANDRADE, D. S.; ZUCARELI, C.; HORÁCIO, E. H.; YUNES, J. S.; BARBOSA, A. P.; ALVES, L. A. R.; CRUZATTY, L. G.; MADDELA, N. R.; GUIMARÃES, M. F. Co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* increases grain yield of maize hybrids. **Rhizosphere** 15 (2020) 100224. DOI: 10.1016/j.rhisph.2020.100224.

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

HORÁCIO E. H.; ZUCARELI, C.; GAVILANES, F. Z.; YUNES, J. S.; DOS SANTOS SANZOVO, A. W.; ANDRADE, D. S. Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, 41: 2015–2028, 2020.

JADHAV, S.; TALEKAR, S. Growth of soybean [*Glycine Max* L. (Merr)] under the influence of blue green algal (BGA) biofertilizer BIOINFOLET. **A. Q. J. Life Sci.**, 17:87–89. 2020.

JING, M. A.; QICHENG, B.; XIAOJIE, W.; GANG, L.; CADISCH, G.; XINGWU, L., JIANGUO, Z.; XIAOLI, S.; ZUBIN, X. Paddy system with a hybrid rice enhances cyanobacteria Nostoc and increases N<sub>2</sub> fixation. **Pedosphere**, 29:374–387. 2019.

KHAN, W. et al. Sea weed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 386- 399 2009.

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

LOPES, Ely Sidney. Fixação Biológica do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta. In: NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2, 2006, Piracicaba, Brasil. **Anais do Simpósio**, v. 1, p. 43-67. 2006.

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

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Academic Press, 2011. 672p.

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, 2, 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S.; SANTOS, O. J. P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial

communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology** First published online: April 01, 2015, 1-14. 2015.

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

NASCIMENTO, F. M.; BICUDO, S. J.; FERNANDES, M. D.; RODRIGUES, J. G. L.; FERNANDES, J. C. Diagnose foliar em plantas de milho em sistema de semeadura direta em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava-PR v. 5, n. 1, p. 67-86, 2012.

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

PICHARDO, S.; PFLUGMACHER, S. Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. **Environ. Toxicol.**, 26 (3):300–306, 2011.

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

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

van RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, set./dez. 2013.

SANGOI, L.; SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 1, n. 39, p. 1141-1150, 2015.

SANTOS, M. M.; GALVÃO, J. C. C.; SILVA, I. R.; MIRANDA, G. V.; FINGER, F. L. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio

direto, e alocação do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) na planta. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, p. 1185-1194, 2010.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBREERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, Embrapa Solos, 5.ed., p. 356, 2018.

SURESH, A.; SOUNDARARAJAN, S.; ELAVARASI, S.; LEWIS, O. F.; THAJUDDIN, N. Evaluation and characterization of the plant growth promoting potentials of two heterocystous cyanobacteria for improving food grains growth. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 17, p. 647–652, 2019.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MARRIEL, I. E.; SILVA, P. R. F. Produtividade de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de nitrogênio cultivado em campo no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, p.110-119, 2017.

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

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; BENETT, C. G. S.; ARF, O.; SÁ, M. E.. Adubação nitrogenada do trigo sob plantio direto no Cerrado brasileiro de baixa altitude. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 1732-1748, 2014.

VILLEGAS, E.; ORTEGA, E.; BAUER, R. Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de proteína de los cereales. **Centro Internacional de Mejoramiento de Mayz y Trigo**. México, D.F. 34 p. 1985.

## 4 ARTIGO 2. Coinoculação de cianobactérias, rizóbio e *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura na produtividade do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.)

### 4.1 Resumo

A associação de cianobactérias com *Rhizobium* e *Azospirillum brasilense* constitui uma prática cultural potencial para promoção de crescimento vegetal, suprimento de nitrogênio (N) e aumento do desempenho produtivo do feijoeiro. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da coinoculação de cianobactérias das espécies *Anabaena cylindrica* e *Calothrix brevíssima*, com *Rhizobium* (*R. tropici* e *R. freirei*) e *Azospirillum brasilense*, em associação a duas doses de N em cobertura no crescimento e desempenho produtivo de feijoeiro comum. O experimento foi conduzido em condições de campo na primeira e segunda época de semeadura do feijão, em Londrina (PR). Utilizou-se o delineamento de parcelas subdivididas em esquema fatorial (12 x 2 +1), com quatro repetições. As parcelas foram constituídas pela inoculação e coinoculação de *Rhizobium* (Riz), *A. brasilense* (Azo), *A. cylindrica* (Ana) e *C. brevissima* (Cal) nas sementes de feijão, e a subparcela por duas doses de N (30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>), além do controle (sem adubação e sem inoculação). Foram avaliadas a altura de plantas, altura de inserção de primeira vagem, massa seca total da planta, massa seca foliar, N acumulado na parte aérea, vagem por planta, grãos por vagem, peso de mil grãos e produtividade de grãos. Em comparação ao tratamento controle, na 1ª época de semeadura verificou-se maior crescimento e desenvolvimento das plantas de feijão coinoculadas, contribuindo para aumentos acima de 700 kg ha<sup>-1</sup> de grãos com Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup> (1085 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), Riz + Azo + Ana + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> (993 e 788 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respetivamente) e Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (839 kg ha<sup>-1</sup> de grãos). Já na segunda safra observaram-se ganhos menores com a coinoculação de Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (688 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (506,7 kg ha<sup>-1</sup> de grãos) e Azo + Cal + 60 kg ha<sup>-1</sup> (com 456 kg ha<sup>-1</sup> de grãos). A associação de rizóbio, *A. brasilense* e cianobactérias com as doses de N utilizadas em cobertura mostrou-se prática agrônômica eficiente para o feijoeiro em condições tropicais, resultando em incrementos no rendimento de grãos comparativamente às plantas não inoculadas e não adubadas.

**Palavras chaves:** *Phaseolus vulgaris* L., *A. cylindrica*, *C. brevissima*, promoção de crescimento vegetal, rizobactérias, fixação biológica de nitrogênio.

### 4.2 Abstract

The association of cyanobacteria with *Rhizobium* and *Azospirillum brasilense* constitutes a potential cultural practice to promote plant growth, the supply of nitrogen (N), and increase the productive performance of common beans. The work aimed to evaluate the effect of the co-inoculation of cyanobacteria of the species *Anabaena cylindrica* and *Calothrix brevissima*, with *Rhizobium* (*R. tropici* and *R. freirei*) and *Azospirillum brasilense* associated with two N rates at topdressing in the growth and productive performance of common bean. The experiment was carried out under field conditions in the first and second common bean sowing seasons, in Londrina (PR). Plots subdivided in a factorial scheme (12 x 2 +1) were used, with

four replications. The plots were constituted by the inoculation and co-inoculation of *Rhizobium* (Riz), *A. brasilense* (Azo), *A. cylindrica* (Ana), and *C. brevissima* (Cal) in the bean seeds, and the subplot by two doses of N (30 and 60 kg N ha<sup>-1</sup>), in addition, to control (without fertilization and without inoculation). Plant height, the height of first pod insertion, total dry mass of the plant, leaf dry mass, accumulated shoot N content, pod per plant, grains per pod, the weight of a thousand grains, and grain yield were evaluated. In comparison to the control treatment, in the 1st sowing season, there was a greater growth and development of the co-inoculated bean plants, contributing to increases above 700 kg ha<sup>-1</sup> of grains with Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup> (1085 kg ha<sup>-1</sup> of grains), Riz + Azo + Ana + 30 and 60 kg N ha<sup>-1</sup> (993 and 788 kg ha<sup>-1</sup>, respectively) and Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (839 kg ha<sup>-1</sup> of grains). In the second harvest, however, smaller gains were observed with the co-inoculation of Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (688 kg ha<sup>-1</sup> of grains), Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (506.7 kg ha<sup>-1</sup>) 1 of grains) and Azo + Cal + 60 kg ha<sup>-1</sup> (with 456 kg ha<sup>-1</sup> of grains). The association of rhizobia, *A. brasilense*, and cyanobacteria with the N rates at topdressing was shown to be an efficient agronomic practice for beans under tropical conditions, resulting in increases in grain yield compared to uninoculated and unfertilized plants.

**Key-words:** *Phaseolus vulgaris* L., *A. cylindrica*, *C. brevissima*, plant growth promotion, rhizobacteria, biological nitrogen fixation.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de grande importância para a alimentação humana em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, onde constitui a principal fonte de proteína, por apresentar baixo valor econômico, quando comparada com proteínas de origem animal (MEZIADI et al., 2016). Além disso, é uma leguminosa rica em carboidratos, minerais como ferro, vitaminas e aminoácidos essenciais (PETRY et al., 2015). É cultivada no Brasil em diversos sistemas de produção, desde pequenos produtores com baixa tecnologia e desempenho produtivo, até médios e grandes produtores, em sistemas altamente tecnificados (SOUZA et al., 2017).

As lavouras de feijão no Brasil apresentam produtividade média relativamente baixa. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento-Conab (2021), na safra 2020/2021 a área plantada foi de 2.945,9 mil hectares, com a produção de 3.250 mil toneladas. A produtividade média brasileira de grãos de feijão foi de 1.103 kg ha<sup>-1</sup>, sendo 1.123, 980 e 1373 kg ha<sup>-1</sup> para primeira, segunda e terceira épocas de semeadura, respectivamente.

Um dos insumos agrícolas mais importantes para obtenção de altos rendimentos de feijão é o fertilizante nitrogenado. Porém, são caros, apresentam baixa eficiência de uso pelas plantas, além de estarem relacionados à poluição ambiental, quando usado em excesso (HUNGRIA et al., 2007). Uma das alternativas para reduzir a necessidade desse nutriente é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por um seletivo grupo de bactérias, denominadas diazotróficas (REIS, 2007).

Pesquisas realizadas na cultura do feijoeiro reportam a inoculação por vários gêneros bacterianos como o *Rhizobium* spp. (SCHLINDWEIN et al., 2008; COATTI et al., 2010; SCHOSSLER et al., 2016; CHEKANAI et al., 2018; PACHECO et al., 2020; HORÁCIO et al., 2020) e *Azospirillum* spp. (RADWAN et al., 2005; HORÁCIO et al., 2020), principalmente visando melhorar a capacidade de FBN, bem como explorar outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal como a produção de fitorreguladores, disponibilização de nutrientes e o biocontrole.

Nesse cenário, uma técnica promissora é a coinoculação, também denominada inoculação mista com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fixadoras de nitrogênio. A combinação de diferentes microrganismos pode produzir

um efeito sinérgico, que superam os resultados produtivos quando estes são utilizados isoladamente.

Pouco se relata sobre a inoculação e coinoculação com cianobactérias, principalmente das espécies *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevíssima* com outras bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, como as dos gêneros *Rhizobium* e *Azospirillum* em leguminosas, especificamente no feijão comum.

As cianobactérias apresentam potencial agrícola como biofertilizantes, produzindo substâncias que estimulam o crescimento de plantas ou até mesmo a FBN (ANDRADE; COLOZI FILHO, 2014), podendo aumentar a produtividade de culturas. Itou et al. (2001), relatam que a *Anabaena cylindrica*, além de contribuir na FBN, também tem atividade na solubilidade do ferro por produzir sideróforos. Para Habib et al. (2011) a *Calothrix* sp. é uma das cianobactérias dominantes em campos de arroz. Elas enriquecem o solo com nitrogênio e carbono, atuam na solubilização de fosfatos, contribuindo assim, na melhoria da agregação do solo.

Em pesquisa desenvolvida por Horácio et al. (2020), avaliando a coinoculação de *Rhizobium*, *Azospirillum* e cianobactérias em condições de casa de vegetação, observaram-se aumento na produção de grãos de feijão comum. Outrossim, Gavilanes et al. (2020), avaliando a coinoculação de *Anabaena cylindrica* com *Azospirillum brasilense*, verificaram aumento do rendimento de grãos de híbridos de milho.

Assim, o feijão comum pode alterar seu crescimento e desempenho produtivo quando inoculado ou coinoculado com bactérias promotoras de crescimento vegetal que apresentam diferentes mecanismos de promoção de crescimento. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação isolada e da coinoculação da *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevíssima* com *Rhizobium* (*R. tropici* e *R. freirei*) e *Azospirillum brasilense*, associadas a doses de N em cobertura, no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Caracterização da área experimental

Foram conduzidos dois experimentos a campo com a cultura do feijoeiro. O primeiro experimento foi instalado na segunda época de cultivo (março a junho) e o segundo, na primeira época de cultivo (setembro a dezembro) de 2019/2020, em área pertencente à Fazenda experimental da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O solo foi classificado como Latossolo Vermelho eutrófico (teor de argila variando de 760 a 820 g kg<sup>-1</sup> entre 0 e 0,40 m de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2018). A área está localizada no município de Londrina (PR), com coordenadas geográficas de 23° 23' de latitude S e 51° 11' de longitude W. A altitude média do local é de 566 m, e o clima, subtropical úmido, do tipo Cfa segundo classificação de Köppen.

A área dos experimentos, nos últimos anos, foi ocupada pela sucessão de milho/aveia, em sistema plantio direto. Em cada experimento, antes da instalação foi realizada a amostragem de solo, nas camadas de 0-20 cm, para análise dos atributos químicos, conforme metodologia descrita por Raij et al. (2001), cujos resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Características químicas do solo da área experimental, antes da instalação dos experimentos, na camada de 0 a 20 cm, na 1ª. e 2ª. época de semeadura do feijão, 2019, Londrina, PR.

	P (Mehlich-1)	C	pH	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
	mg dm <sup>-3</sup>	g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			(%)
1ª. Época	26,90	15,02	5,8	0,61	6,7	2,3	5,48	13,60	54,35
2ª. Época	16,45	16,45	5,7	0,64	6,0	2,2	6,07	13,45	54,19

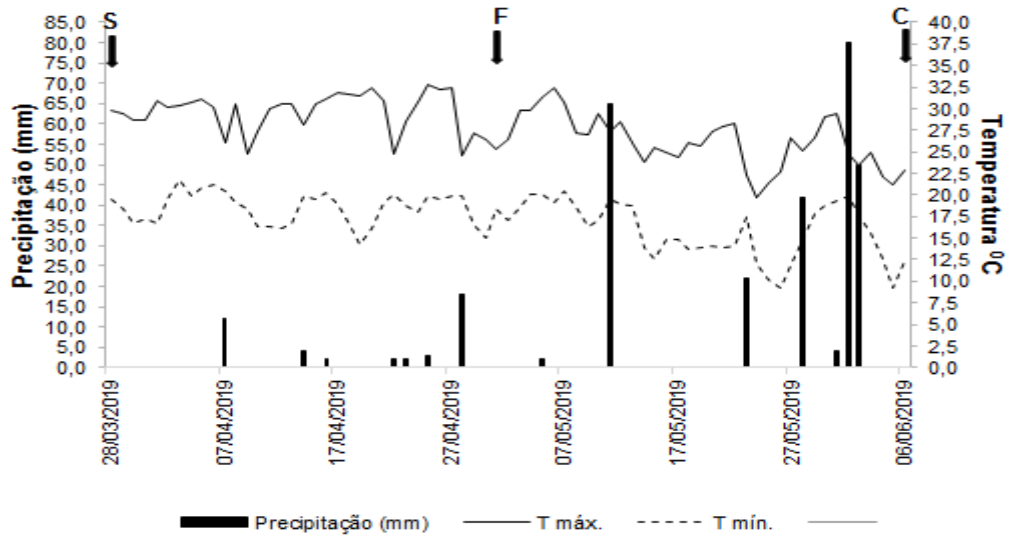
Fonte: Elaboração do próprio autor

Os dados meteorológicos de precipitação pluvial e temperaturas durante a condução dos experimentos foram obtidos junto à estação meteorológica da UEL (Figura 8).

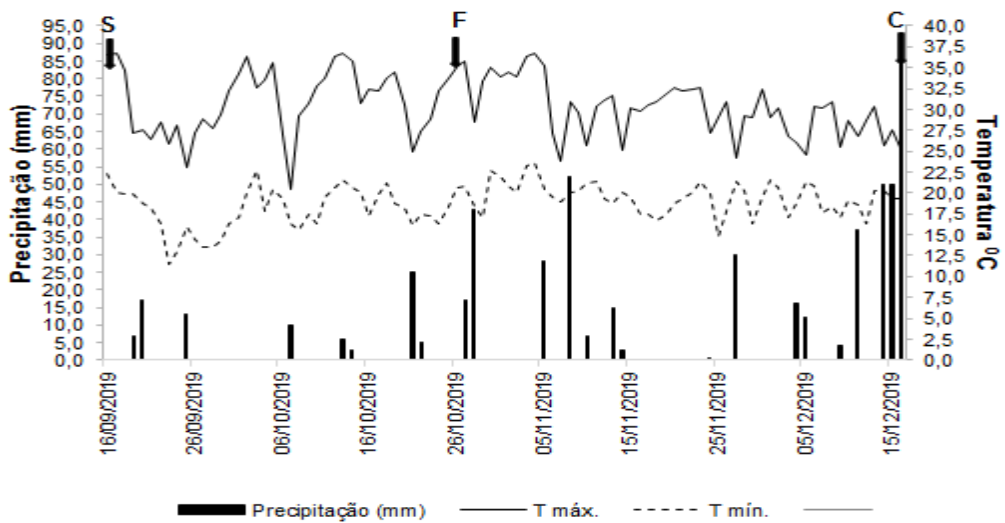
Figura 8. Precipitação pluvial e temperaturas máxima e mínima (T máx e T mín) referente aos períodos experimentais de (A) 2ª. época de semadura (28/03 a

06/06/2019) e (B) 1ª. época de semeadura do feijão comum (16/09/2019 a 15/12/2019), Londrina-PR.

(A)



(B)



Onde: S- semeadura, F- floração e C- colheita.

Fonte: O Autor.

#### 4.4.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado em cada experimento foi parcelas subdivididas em esquema fatorial (12 x 2 +1), com quatro repetições. Na parcela os tratamentos alocados foram inoculação isolada de rizóbio (*Rhizobium tropici* + *Rhizobium freire*), de *Azospirillum brasilense*, *Anabaena cylindrica*, *Calothrix brevíssima* e

coincocações duplas de rizobio + *A. brasilense*, rizobio + *C. brevíssima*, rizobio + *A. cylindrica*, *A. brasilense* + *C. brevíssima*, *A. brasilense* + *A. cylindrica* e coincocações triplas de rizobio + *A. brasilense* + *C. brevíssima* e de rizobio + *A. brasilense* + *A. cylindrica*. Na subparcela alocou-se as duas doses de N em cobertura (30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>). Todos os tratamentos receberam 30 kg N ha<sup>-1</sup> na base, ou seja, no momento da semeadura, além do tratamento controle sem inoculação e sem N-mineral.

A subparcela experimental foi constituída de seis linhas de semeadura com quatro metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,45 m e 12 plantas por metro linear, totalizando 10,8 m<sup>2</sup> de área útil.

#### 4.4.3 Implantação e condução da cultura do feijoeiro

Nas duas épocas de semeadura, foi utilizada a cultivar de feijão IPR Curió, do grupo comercial Carioca, com aproximadamente 70 dias de ciclo, considerado precoce. Apresenta porte ereto, potencial médio produtivo de mais de 3,8 t ha<sup>-1</sup> e 272 g de massa média de mil grãos (IDR-IAPAR, 2021).

As espécies de cianobactérias avaliadas, originadas do Banco de Cultivos de Cianobactérias e Ficotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil, foram obtidas do Laboratório de Microbiologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). As cepas apresentavam capacidade de fixar N<sub>2</sub> atmosférico e de produzir elevadas quantidades de biomassa em crescimento sem qualquer forma de N combinado na água do meio de cultivo, com concentração de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (GAVILANES et al., 2020). Foram utilizados ainda inoculantes comerciais para aplicação de *A. brasilense* (estirpes AbV5 e AbV6 com 2,0 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) e de bactérias do gênero *Rhizobium* contendo *R. tropici* (SEMIA 4080 = PRF81) + *R. freirei* (SEMIA 4077 = CIAT899) com concentração de 3,0 x 10<sup>9</sup> células viáveis por mL.

As sementes de feijão foram inoculadas previamente à semeadura. A dose aplicada das cianobactérias foi de 5 mL para 1 kg de sementes, contendo aproximadamente densidade de 1.0 x 10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>. Para o *A. brasilense* foi aplicada a dose de 100 mL para cada 25 kg de sementes, e para os rizóbios aplicou-se aproximadamente 100 mL para cada 40 kg de sementes, respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante do produto

comercial. Nas coinoculações foram utilizadas as mesmas doses de cada inoculante. A inoculação consistiu em se colocar as sementes e os inoculantes em saco plástico, com posterior agitação para distribuição homogênea.

A semeadura foi realizada de forma mecanizada, em área previamente preparada por aração e gradagem (aproximadamente 0,30 cm de profundidade). O primeiro experimento foi semeado em 28 de março de 2019 (2ª época de semeadura do feijoeiro) e, o segundo, em 16 de setembro de 2019 (1ª época de semeadura).

A adubação de base foi constituída pela aplicação do formulado N-P-K (05-15-15), com base nas recomendações de adubação para a cultura do feijão comum, sendo 30 kg N ha<sup>-1</sup>, 60 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> e 60 K<sub>2</sub>O kg ha<sup>-1</sup>. As adubações de N em cobertura foram efetuadas em suas respectivas doses, utilizando a uréia (45% de N) no início do estágio fenológico V4, caracterizado pela presença da terceira folha trifoliolada, completamente aberta em 50% das plantas (FERNÁNDEZ et al., 1985).

A irrigação foi realizada por sistema de aspersão atendendo as necessidades do sistema solo-planta, principalmente na fase de emergência das plântulas, de florescimento pleno e de enchimento de grãos.

Em ambos os experimentos foram realizadas duas aplicações de defensivos para o controle de plantas daninhas com os herbicidas Bentazona (Basagran ®) na dose de 1,2 L ha<sup>-1</sup> e 150 a 250 L ha<sup>-1</sup> de calda e Propiconazol (Flex) na dose de 9,9 a 1,0 L ha<sup>-1</sup> para 200 a 300 L ha<sup>-1</sup> de calda. No período da floração foram realizadas duas aplicações para prevenção de doenças fúngicas, utilizando-se o fungicida comercial Fox com princípio ativo proclorazoxol, na dose de 0,4 a 0,5 L ha<sup>-1</sup> para 200 L ha<sup>-1</sup> da calda, aos 35 e 50 dias após a emergência. Foi realizada uma aplicação para o controle de pragas utilizando-se o inseticida Tiametoxan + lambda-cialotrina (Engeo Pleno) na dose de 100 a 125 mL ha<sup>-1</sup> para 200 L ha<sup>-1</sup> de calda, aos 40 e 35 dias após a emergência, nas duas épocas de semeadura do feijão comum.

#### **4.4.4 Avaliações**

Por ocasião do florescimento foram tomadas quatro plantas ao acaso dentro da área útil da parcela experimental. Foi avaliada a altura de planta e de inserção de 1ª. vagem (cm), por meio da medida da distância entre a superfície do solo e o ápice

da planta, e da primeira vagem no racimo, respectivamente. Após a coleta, as quatro plantas por subparcela foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar à temperatura média de 65°C, até atingir massa constante. Amostras de matéria seca da parte aérea foram moídas em moinho de laboratório e o teor de N foi determinado de acordo com o método de digestão Kjeldahl (BREMNER; KEENEY, 1965).

Ao final do ciclo da cultura (6 de julho e 15 de dezembro de 2019 para 2<sup>a</sup>. e 1<sup>a</sup>. época, respetivamente), foram colhidas todas as plantas da área útil, sendo separadas 8 plantas para a determinação do número de vagem por planta e grãos por vagem através de contagem. A massa de mil grãos foi determinada segundo metodologia descrita por Brasil (2009), em que, as sementes foram separadas em oito repetições de cem, e na sequência procedeu-se às determinações e o resultado expresso pela média. O valor da massa obtido foi corrigido para 13% de umidade.

A produtividade de grãos foi obtida por meio da pesagem dos grãos colhidos na área útil da subparcela experimental, com umidade corrigida para 13% (umidade de armazenamento para grãos de feijão) e conversão dos resultados para kg ha<sup>-1</sup>.

#### **4.4.5. Análise estatística**

Atendido os pressupostos estatísticos, foi realizada análise conjunta dos dados das duas épocas de cultivo. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo consideradas normais, não necessitando de transformação. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) no software SISVAR (FERREIRA, 2011). Foram realizados contrastes ortogonais, para comparação dos tratamentos de inoculação e coinoculação com o tratamento controle, pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade com auxílio do software GENES. Ainda, foi calculada a produtividade relativa dos tratamentos em comparação com o tratamento testemunha (não inoculado e não adubado).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi constatada interação tripla significativa ( $p < 0,05$ ) entre doses de N vs. época vs. inoculação (N x E x I) para massa seca total de plantas (MSTP) e massa seca foliar (MSF) (Tabela 11). Verificou-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da interação dupla entre época vs. inoculação (E x I) para número de grãos por vagem (NGV) (Tabela 12) e interação dupla entre nitrogênio vs. inoculação (N x I) para N acumulado na parte aérea (NA) (Tabela 11).

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para o fator época de semeadura (E) nas características altura de plantas (AP), altura de inserção de vagem (AIV), teor de nitrogênio foliar (TN) (Tabela 11) e número de vagens por planta (NVP) (Tabela 12). A 1ª época foi superior à 2ª época de semeadura do feijoeiro para estas características, devido às condições climáticas mais favoráveis para o estabelecimento das bactérias e efeitos no crescimento e desempenho produtivo das plantas. A melhor dose de N em cobertura observada foi de 30 kg N ha<sup>-1</sup>, quando comparado com a dose de 60 kg N ha<sup>-1</sup>. Associa-se também a este fato, as características físico-químicas do solo, a nutrição equilibrada que foi ministrada para todos os tratamentos, aliadas a adequada distribuição de água observada durante o ciclo da cultura.

Em relação ao fator inoculação houve efeito significativo para altura de inserção de primeira vagem (Tabela 11) e número de vagem por planta (Tabela 12). Para a característica inserção de primeira vagem, a coinoculação de *Rhizobium* (Riz) + *Azospirillum brasilense* (Azo) + *Calothrix brevíssima* (Cal) e de *Rhizobium* (Riz) + *A. brasilense* (Azo) + *Anabaena cylindrica* (Ana) foram superiores em comparação aos demais tratamentos, demonstrando o potencial da associação do rizóbio com *A. brasilense* e cianobactérias. A altura de inserção da primeira vagem é um parâmetro de interesse quando se considera a possibilidade de colheita mecanizada. Segundo Souza et al. (2009) a arquitetura da planta de feijão se constitui um problema, quando se considera a baixa altura de inserção da primeira vagem, pois esta característica inviabiliza a colheita com automotriz.

Para o número de vagem por planta, a inoculação de *C. brevíssima*, associação dupla de Riz + Azo, de Riz + Ana, de Riz + Cal, Azo + Cal, Azo + Ana, inoculação tripla de Riz + Azo + Cal e de Riz + Azo + Ana apresentaram maiores valores (Tabela 12), demonstrando sinergismo entre bactérias fixadoras de N e de

promoção de crescimento de plantas. A associação de rizóbios com outras BPCPs tem se mostrado como alternativa promissora para aumento do crescimento das plantas, melhoria da nodulação e otimização da fixação de N<sub>2</sub> em leguminosas como caupi (ARAÚJO et al., 2012; LIMA et al., 2011) e soja (FACHINELLI; CECCON, 2020; HUNGRIA et al., 2013).

Tabela 11. Valores médios e análise de variância (*p*) conjunta da 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> época de semeadura do feijoeiro, 2019. Altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), matéria seca total (MST), matéria seca foliar (MSF) e de teor de nitrogênio foliar (TN) do feijão comum inoculado e coinoculado com *Rhizobium*, *A. brasilense*, *C. brevíssima* e *A. cylindrica*, associadas a duas doses de N em cobertura. Interação do nitrogênio em cobertura (N), inoculação (I) e época (E), Londrina-PR.

Causas de Variação	AP	AIV	MST	MSF	TN
<b>Quadrado médio</b>					
Bloco (Época)	23,98	1,18	372,94	64,98	99,9
Época de Semeadura (E)	4012,28*	947,90*	128521,12	13909,4	385,90*
Inoculação (I)	64,83	3,17*	342,72	105,14	48,34
Nitrogênio (N)	2,27	0,08	345,88	171,01	34,51
E x I	61,81	2,44	289,54	55,64	26,78
N x E	9,94	0,61	1073,05	115,94	16,57
N x I	10,33	0,88	440,16	87,38	50,85*
N x E x I	20,67	1,61	315,14*	57,94*	10,72
Resíduo	16,42	1,68	33,76	19,89	23,59
<b>Época de Semeadura</b>	___ (cm) ___		___ (g 4 plantas <sup>-1</sup> ) ___		(g kg <sup>-1</sup> )
1 <sup>a</sup> . Época	56,14 a	11,15 a	91,89	43,28	45,68 a
2 <sup>a</sup> . Época	46,99 b	6,70 b	40,14	26,26	42,85 b
<b>Inoculação (I)</b>					
N-mineral	53,58 a	8,34 b	68,46 a	34,01 a	47,64 a
Riz	51,16 a	8,61 b	64,84 a	33,11 a	46,01 a
Azo	49,87 a	8,91 b	63,33 a	31,63 a	41,26 a
Cal	48,73 a	8,86 b	57,58 a	31,99 a	43,86 a
Ana	49,98 a	8,68 b	59,99 a	32,16 a	43,64 a
Riz + Azo	49,36 a	8,93 b	69,30 a	35,98 a	43,60 a
Riz + Cal	51,90 a	9,00 b	61,92 a	32,54 a	42,83 a
Riz + Ana	54,13 a	9,10 b	72,89 a	38,89 a	42,78 a
Azo + Cal	53,39 a	9,00 b	68,88 a	36,13 a	42,83 a
Azo + Ana	50,94 a	8,28 b	65,81 a	35,44 a	46,27 a
Riz + Azo + Cal	50,80 a	9,46 a	68,10 a	36,71 a	44,34 a
Riz + Azo + Ana	54,71 a	9,90 a	71,14 a	38,69 a	44,92 a
<b>N-Cobertura (kg ha<sup>-1</sup>)</b>					
30	54,15 a	8,94 a	67,36 a	35,72 a	43,84 a
60	52,63 a	8,91 a	64,68 b	33,83 b	44,69 a

CV (%) 7,86 14,55 8,8 12,83 10,97

Interação época vs. inoculação (E x I), nitrogênio vs. época (N x E), nitrogênio vs. inoculação (N x I), nitrogênio vs. época vs. inoculação, coeficiente de variação (CV),\*- significativo a 5% de probabilidade; Nitrogênio-N mineral, Riz- *Rhizobium* (*R. topici* + *R. freirei*), Azo- *Azospirillum brasilense*, Cal- *Calothrix brevíssima*, Ana- *Anabaena cylindrica*. Letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 12. Valores médios e análise de variância (*p*) conjunta da 1ª e 2ª época de semeadura do feijoeiro, 2019. Número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) do feijão comum inoculado e coinoculado com *Rhizobium*, *A. brasilense*, *C. brevíssima* e *A. cylindrica*, associadas a duas doses de N em cobertura. Interação do nitrogênio em cobertura (N), inoculação (I) e época (E), Londrina-PR.

Causas de Variação	NVP	NGV	MMG	PG
<b>Quadrado médio</b>				
Bloco (Época)	14,86	0,64	121,59	119876
Época de Semeadura (E)	45,25*	77,39*	5072,77	1849028
Inoculação (I)	14,08*	0,34	209,98	271889
Nitrogênio (N)	15,19	0,16	822,12*	18119,6
E x I	5,89	0,69*	266,51	271889
N x S	0,72	0,18	4,97	737279
N x I	8,9	0,26	112,68	363586
N x E x I	5,96	0,5	172,69	235130
Resíduo	7,11	0,34	109,51	303913
<b>Época de Semeadura</b>	___ (nº.) ___		(g)	(kg ha <sup>-1</sup> )
1ª. Época	16,24 a	5,69 a	218,3 a	2882 a
2ª. Época	15,27 b	4,42 a	221,5 a	2905 a
<b>Inoculação</b>				
N-mineral	14,40 b	5,18 a	218,39 a	2752 a
Riz	14,39 b	5,17 a	212,53 a	2885 a
Azo	15,06 b	4,93 a	211,76 a	2571 a
Cal	15,71 a	5,18 a	212,04 a	2782 a
Ana	15,38 b	4,84 a	212,04 a	2888 a
Riz + Azo	16,89 a	5,09 a	223,59 a	2915 a
Riz + Cal	16,67 a	4,78 a	215,02 a	3071 a
Riz + Ana	16,04 a	5,24 a	217,36 a	2889 a
Azo + Cal	16,23 a	5,14 a	214,60 a	2729 a
Azo + Ana	15,96 a	5,10 a	217,33 a	2846 a
Riz + Azo + Cal	15,08 b	4,99 a	220,04 a	2873 a
Riz + Azo + Ana	17,32 a	5,00 a	219,50 a	3000 a
<b>N-Cobertura (kg ha<sup>-1</sup>)</b>				
30	15,48 a	5,02 a	214,32 b	2860 a
60	16,04 a	5,08 a	218,46 a	2840 a
CV (%)	16,92	11,47	4,84	19,34

Interação época vs. inoculação (E x I), nitrogênio vs. época (N x E), nitrogênio vs. inoculação (N x I), nitrogênio vs. época vs. inoculação, coeficiente de variação (CV),\* - significativo a 5% de probabilidade; Nitrogênio-N mineral, Riz- *Rhizobium* (*R. topici* + *R. freirei*), Azo- *Azospirillum brasilense*, Cal- *Calothrix brevissima*, Ana- *Anabaena cylindrica*. Letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Avaliando-se o efeito das doses de N em cobertura dentro de cada época de semeadura do feijão, constatou-se que os tratamentos com *A. brasilense*, *A. cylindrica*, coinoculação de Riz + Cal, Azo + Ana, Riz + Azo + Cal, Riz + Azo + Ana na primeira época de semeadura do feijão, obtiveram melhores resultados com a dose de 30 kg N ha<sup>-1</sup> para a massa seca total (MST) (Tabela 13). Para os tratamentos Riz, Riz + Cal na segunda época de cultivo, verificou-se que a dose de 60 kg N ha<sup>-1</sup> foi a melhor, com resultados superiores. Os demais tratamentos, independente das épocas de semeadura e doses de N não apresentaram diferenças significativas.

Para a massa seca foliar (MSF) verificou-se que a inoculação de *A. cylindrica* e coinoculação de Riz + Cal na 1ª época de semeadura, a melhor dose foi de 30 kg N ha<sup>-1</sup>, enquanto que para a coinoculação de Riz + Ana na 2ª época de semeadura do feijão, a dose de 60 kg N ha<sup>-1</sup> foi melhor (Tabela 13).

A massa seca total (MST) e massa seca foliar (MSF) do feijoeiro, em função das épocas de semeadura dentro de cada dose de N em cobertura, foram melhores na 1ª época em relação à 2ª época de semeadura para todos os tratamentos avaliados (Tabela 13). Esta variação entre as épocas de semeadura pode estar relacionada às condições climáticas favoráveis para o cultivo, sendo que na primeira época as chuvas são mais regulares, as temperaturas mais adequadas e radiação solar são maiores.

Em relação à coinoculação, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) no sistema, como o *A. brasilense*, promove aumento do crescimento radicular uma vez que estas são responsáveis pelo aumento na produção de auxinas, citocininas e giberelinas, fitohormônios responsáveis pelo crescimento vegetal (DARTORA et al., 2013). Por outro lado, a inclusão de cianobactérias no sistema demonstra seu potencial para uso como biofertilizantes e promotor de crescimento de plantas na coinoculação com outras bactérias promotoras de crescimento, como já observado na cultura do milho (SURESH et al., 2019).

O N é o nutriente base para aumentar o índice de área foliar, como discutido anteriormente e, conseqüentemente, as taxas de fotossíntese, promovendo assim maior acúmulo de matéria seca nas plantas (MARSCHNER, 2012). A adubação nitrogenada aumenta a disponibilidade do nutriente no solo e, a absorção deste pelo sistema radicular é maior, resultando em incrementos no teor de N na parte aérea do feijão, o que resulta em maior acúmulo de massa seca na planta (SORATTO et al., 2017). Bettioli et al. (2019) avaliando a inoculação, coinoculação e adubação mineral em cultivares de feijão comum de ciclo precoce, verificaram que a cultivar IAC Imperador foi superior nos tratamentos N-mineral em cobertura, independentemente da dose de N utilizada, com a coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense*.

Tabela 13. Valores médios de matéria seca total (MST) e matéria seca foliar (MSF) do feijão comum inoculado e coinoculado com *R. tropici*, *A. brasilense*, *C. brevissima* e *A. cylindrica*, associadas a duas doses de N em cobertura. Interação de inoculação, épocas de semeadura e doses de N em cobertura (N), Londrina-PR.

Tratamento	Época	MST		MSF	
		(g 4 plantas <sup>-1</sup> )			
		N-cobertura (kg ha <sup>-1</sup> )			
		30	60	30	60
N-mineral	1 <sup>a</sup> .	95,70 aA	100,88 aA	42,25 aA	43,60 aA
	2 <sup>a</sup> .	37,85 aB	39,43 aB	25,95 aB	24,25 aB
<i>Rhizobium</i>	1 <sup>a</sup> .	87,55 bA	96,70 aA	41,20 aA	43,08 aA
	2 <sup>a</sup> .	36,85 aB	38,30 aB	24,45 aB	23,73 aB
<i>A. brasilense</i> .	1 <sup>a</sup> .	95,88 aA	86,23 bA	42,15 aA	39,33 aA
	2 <sup>a</sup> .	33,42 aB	37,80 aB	22,75 aB	22,30 aB
<i>C. brevissima</i>	1 <sup>a</sup> .	71,93 aA	77,65 aA	35,30 aA	37,23 aA
	2 <sup>a</sup> .	40,70 aB	40,03 aB	27,70 aB	27,80 aB
<i>A. cylindrica</i>	1 <sup>a</sup> .	88,58 aA	69,80 bA	42,10 aA	35,13 bA
	2 <sup>a</sup> .	40,00 aB	40,03 aB	26,33 aB	25,13 aB
<i>Rhizob.</i> + <i>A. bras.</i>	1 <sup>a</sup> .	101,60 aA	96,63 aA	49,48 aA	44,08 aA
	2 <sup>a</sup> .	38,63 aB	40,35 aB	24,63 aB	25,75 aB
<i>Rhizob.</i> + <i>C. brev.</i>	1 <sup>a</sup> .	82,95 bA	100,55 aA	39,67 aA	39,68 bA
	2 <sup>a</sup> .	98,90 aB	35,25 aB	23,70 aB	20,23 aB
<i>Rhizob.</i> + <i>A. cylind.</i>	1 <sup>a</sup> .	101,48 aA	101,85 aA	49,05 aA	48,38 aA
	2 <sup>a</sup> .	40,05 aB	48,20 aB	24,78 bB	33,40 aB
<i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	1 <sup>a</sup> .	89,43 aA	98,00 aA	40,70 aA	46,33 aA
	2 <sup>a</sup> .	43,35 aB	44,75 aB	28,30 aB	29,20 aB
<i>A. bras.</i> + <i>A. cylind.</i>	1 <sup>a</sup> .	99,88 aA	76,80 bA	48,25 aA	37,60 bA
	2 <sup>a</sup> .	42,83 aB	43,75 aB	27,63 aB	28,30 aB
<i>Rhizob.</i> + <i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	1 <sup>a</sup> .	115,45 aA	70,98 bA	53,30 aA	37,48 bA
	2 <sup>a</sup> .	44,98 aB	40,88 aB	30,35 aB	25,75 aB
<i>Rhizob.</i> + <i>A. bras.</i> + <i>A.</i>	1 <sup>a</sup> .	116,75 aA	82,15 bA	56,70 aA	39,98 bA

*cylind.* 2<sup>a</sup>. 41,93 aB 43,73 aB 30,60 aB 27,35 aB

Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Observou-se efeito significativo da coinoculação de Azo + Ana, onde maior teor de N foliar foi verificado na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup>, com 50,5 g kg<sup>-1</sup>, indicando que o rizóbio inoculado ou coinoculado com outros microrganismos não influenciou a característica em avaliação (Tabela 14). Por outro lado, na avaliação de doses de N dentro da inoculação, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Apesar destes resultados não evidenciarem um efeito isolado, assim como combinado destas bactérias com a adubação nitrogenada, a concentração de nitrogênio em todos os tratamentos manteve-se na faixa de 30 a 50 g kg<sup>-1</sup> considerada adequada para a nutrição do feijoeiro (AMBROSANO et al., 1997).

Resultados similares foram observados por Veronezi et al. (2012), ao avaliar o teor de nitrogênio foliar em feijoeiro em condições controladas de casa de vegetação, em função da testemunha sem inoculação e testemunha nitrogenada, a inoculação com rizóbio e coinoculação não resultaram em diferenças significativas. Pelegrin et al. (2009), ao analisar o efeito das doses de 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia e a inoculação de *Rhizobium tropici* combinada ou não com aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura, não verificaram diferenças no teor de nitrogênio da parte aérea.

Tabela 14. Valores médios de teor de N foliar (TN) do feijão inoculado e coinoculado com *Rhizobium*, *A. brasilense*, *C. brevíssima* e *A. cylindrica*, associadas a duas doses de N em cobertura. Interação entre doses de N em cobertura (N) e inoculação (I) de microrganismos.

Tratamento	TN (g kg <sup>-1</sup> )	
	30 kg N ha <sup>-1</sup>	60 kg N ha <sup>-1</sup>
N-mineral	50,00 aA	45,30 aA
<i>Rizobio</i>	44,55 aA	47,48 aA
<i>A. brasilense</i>	40,98 aA	41,55 aA
<i>C. brevissima</i>	43,13 aA	44,60 aA
<i>A. cylindrica</i>	41,60 aA	45,68 aA
<i>Rizobio</i> + <i>A.bras.</i>	45,33 aA	41,95 aA
<i>Rizobio</i> + <i>C. brev.</i>	41,60 aA	44,05 aA
<i>Rizobio.</i> + <i>A. cylind.</i>	42,30 aA	43,25 aA
<i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	45,28 aA	42,70 aA
<i>A.bras.</i> + <i>A. cylind</i>	42,05 bA	50,50 aA
<i>Rizobio</i> + <i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	44,90 aA	43,81 aA
<i>Rizobio</i> + <i>A. bras.</i> + <i>A. cylind.</i>	44,41 aA	45,43 aA

Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade.

Para o número de grãos por vagem houve diferença entre as safras, sendo que o segundo cultivo (1ª. época de semeadura) foi superior comparativamente ao primeiro cultivo (2ª. época de semeadura), em todos os tratamentos (Tabela 15). Avaliando as épocas dentro da inoculação, observa-se que em cada safra de cultivo, a inoculação assim como a coinoculação de *Rhizobium*, *A. brasilense* e cianobactérias utilizadas não influenciaram o número de grãos por vagem, provavelmente por se tratar de uma característica de alta herdabilidade genética, dependente de cada cultivar (TORRES et al., 2014). O número de sementes por vagem normalmente é uma característica varietal pouco influenciada pelo ambiente ou por práticas culturais adotadas (ARF et al., 2004). Resultados diferentes foram observados por Horácio et al. (2020), avaliando a coinoculação de rizóbio, *Azospirillum* e cianobactérias da espécie *A. cylindrica* em feijão comum. Os autores observaram maior número de grãos por vagem em tratamentos com adubação nitrogenada, inoculação e coinoculação de rizóbio, *A. brasilense* e cianobactéria da espécie *A. cylindrica*.

Tabela 15. Valores médios de número grãos por vagem (NGV) do feijão comum inoculado e coinoculado com *Rhizobium*, *A. brasilense*, *C. brevíssima* e *A. cylindrica*, associadas a duas doses de N em cobertura. Interação entre épocas de semeadura (E) e Inoculação (I) de microrganismos

Tratamento	Épocas de semeadura	
	1ª. Época	2ª. Época
N-mineral	5,69 aA	4,68 bA
<i>Rhizob.</i> ( <i>R. tropici</i> + <i>R. freire</i> )	5,95 aA	4,39 bA
<i>A. brasilense</i>	5,46 aA	4,40 bA
<i>C. brevissima</i>	5,69 aA	4,66 bA
<i>A. cylindrica</i>	5,43 aA	4,26 bA
<i>Rhizob.</i> + <i>A.bras.</i>	5,55 aA	4,63 bA
<i>Rhizob.</i> + <i>C. brev.</i>	5,51 aA	4,05 bA
<i>Rhizob.</i> + <i>A. cylind.</i>	6,23 aA	4,26 bA
<i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	5,46 aA	4,83 bA
<i>A.bras.</i> + <i>A. cylind</i>	5,71 aA	4,50 bA
<i>Rhizob.</i> + <i>A. bras.</i> + <i>C. brev.</i>	5,58 aA	4,40 bA
<i>Rhizob.</i> + <i>A. bras.</i> + <i>A. cylind.</i>	6,01 aA	3,99 bA

Letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade.

O maior valor de massa de mil grãos foi verificado com a dose de 60 kg N ha<sup>-1</sup> com 218,46 g, comparativamente a dose de 30 kg N ha<sup>-1</sup> com 214,32 g (Tabela 12).

Grande quantidade de N é extraída e exportada pela cultura do feijão comum (SORATTO et al., 2014), uma vez que seu grão é constituído por 20-25% de proteína (ou seja, uma macromolécula de N). Porém, esperava-se o aumento da massa de grãos com a aplicação das doses de N utilizadas, o que foi confirmado pelos resultados deste estudo. Santos e Fageria (2007) também relataram aumento significativo no peso do grão de feijão com a aplicação de N.

Analisando-se os contrastes entre todos os tratamentos em comparação com o controle, a altura de plantas (AP), o teor de N foliar (TN), o número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), a massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) não mostraram efeito significativo na 2ª. época de semeadura do feijoeiro (Tabelas 16 e 17). Tal fato ocorreu independentemente das formas de inoculação ou da adição de N em cobertura. A ausência de efeito significativo pode ser atribuída ao fato de as plantas terem sido capazes de absorver o N de fontes alternativas à fixação biológica pelas bactérias utilizadas. Neves et al. (1982) afirmam que plantas de feijoeiro e de feijão caupi, mesmo noduladas, tem disponível duas fontes de N, o solo e o fertilizante nitrogenado. Portanto, na presente pesquisa, as plantas foram supridas não só pelo N fornecido pelas estirpes, mas também por aquele presente na solução do solo na forma de íons inorgânicos resultantes da mineralização microbiana da matéria orgânica, e isso pode ter influenciado nas respostas da cultura às fontes de N testadas. Brito et al. (2009) avaliaram as contribuições relativas à FBN, ou seja, o N do solo e do fertilizante nitrogenado sobre o desenvolvimento do feijão caupi. Estes autores observaram maior contribuição da fixação biológica dentre os tratamentos avaliados. No entanto, ressaltam também ter havido a contribuição do N fornecido tanto pelo solo como pelo fertilizante nitrogenado.

Para a altura de inserção de primeira vagem (Tabela 16) observou-se efeito significativo do contraste, em que a coinoculação com *Riz + Azo + Ana* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> apresentou média superior ao controle (8,63 cm), evidenciando à provável produção de fitormônios pelos promotores de crescimento, entre outros fatores como fixação de nitrogênio, supressão de patógenos e solubilização de nutrientes.

Para a matéria seca total, a coinoculação com *Riz + Ana* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> diferiu do controle, apresentando peso médio de 48,18 g planta<sup>-1</sup> (Tabela 16). Os demais tratamentos não diferiram do controle. Já, para a massa seca foliar (Tabela 16), a coinoculação com *Riz + Ana* + 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *Riz + Ana + Cal* + 30 kg N ha<sup>-1</sup> ou

*Riz + Azo + Ana + 30 kg N ha<sup>-1</sup>* foram superiores em relação ao controle, demonstrando maior eficiência da interação da cianobactéria *A. cylindrica* com o rizóbio e *A. brasilense*, em associação à adubação nitrogenada. Na cultura do milho, o uso de cianobactérias como inoculante contribui para a absorção de macro e micronutrientes, favorecendo comunidades microbianas na rizosfera de híbridos de milho, promovendo uma economia significativa de fertilizantes químicos (PRASANNA et al., 2015, 2016). Em adição, Gualter et al. (2008; 2011) acrescentam que, quando o N é fornecido em quantidades significativas contribui para um melhor acúmulo de matéria seca. Sendo assim, a associação de *A. cylindrica* com rizóbio e *A. brasilense*, em associação à adubação nitrogenada, resultaram em melhor suprimento de N, apresentando elevado acúmulo de matéria seca em comparação à inoculação ou adubação nitrogenada isoladas. Dessa forma, as combinações mencionadas demonstram esse potencial, se destacando das demais formas de inoculação. Por outro lado, Veronezi et al. (2012) não observaram diferenças para massa seca da parte aérea entre os tratamentos que tiveram as sementes de feijão inoculadas com *R. tropici* ou coinoculadas com *R. tropici* e *A. brasilense*, com os sem inoculação ou N-mineral adicionada.

No segundo cultivo (1<sup>a</sup>. época de semeadura do feijão) (Tabelas 18 e 19), houve efeito significativo dos contrastes para altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), massa seca total e foliar (MST e MSF), teor de N foliar (TN) e número de vagem por planta (NVP). O número de grãos por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) não apresentaram efeito significativo para os contrastes. Em relação à altura de plantas, a inoculação com *Rhizobium* + 30 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura, *A. brasilense* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *C. brevissima* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *A. cylindrica* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, e a coinoculação com *Riz + Azo + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>*, *Azo + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup>* e *Riz + Azo + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup>*, apresentaram médias inferiores comparativamente ao controle. Os demais tratamentos foram estatisticamente iguais ao controle.

Para a altura de inserção de primeira vagem, todos os tratamentos, exceto com a coinoculação de *Azo + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup>* em cobertura, e inoculação de *Rhizobium* + 30 kg N ha<sup>-1</sup>, foram estatisticamente superiores ao controle.

A inoculação e coinoculação de *Rhizobium*, *A. brasilense*, *C. brevissima* e *A. cylindrica* associadas a 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura foram superiores à testemunha na massa seca total e massa seca foliar, demonstrando maior simbiose

dos microrganismos com as doses de N utilizadas (Tabela 18). Em relação ao teor de N foliar, o tratamento adubado com N-mineral + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, inoculação com *Rhizobium* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *C. brevissima* + 30 kg N ha<sup>-1</sup>, *A. cylindrica* + 60 kg N ha<sup>-1</sup>, e coinoculação com *Riz* + *Azo* + 30 kg N ha<sup>-1</sup>, *Riz* + *Ana* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *Azo* + *Cal* + 30 kg N ha<sup>-1</sup>, *Azo* + *Ana* + 60 kg N ha<sup>-1</sup>, *Riz* + *Azo* + *Cal* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> e *Riz* + *Azo* + *Ana* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup>, foram superiores ao controle, demonstrando resposta positiva da inoculação e coinoculação dos três microrganismos, associados a doses de N em cobertura, quando comparado ao tratamento não inoculado e não adubado. Esse comportamento pode ser devido ao fato de que estes tratamentos receberam adequada adubação nitrogenada na semeadura e no início dos estádios reprodutivos (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2008).

Quanto ao número de vagens por planta, a coinoculação com *Riz* + *Azo* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura e *Azo* + *Cal* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> foram superiores ao controle com 19,18 e 22,05 vagens por planta, respectivamente (Tabela 19). O número de vagens por planta é o principal componente na determinação da produtividade do feijoeiro (FAGERIA et al., 2008), sendo de suma importância para que a cultivar alcance seu potencial produtivo. Tal componente não é somente controlado geneticamente, pois fatores ambientais e de manejo também influenciam esta característica (FAGERIA et al., 2008).

Tabela 16. Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com *Rhizobium*, *A. brasilense* e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação), para altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), massa seca total (MST), massa seca foliar (MSF), teor de N foliar (TN), na 2ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019.

Tratamento + N (kg ha <sup>-1</sup> )	AP	AIV	MST	MSF	TN
	(cm)		(g 4 plantas <sup>-1</sup> )		(g kg <sup>-1</sup> )
Controle	44,40	5,53	31,00	18,23	40,33
N-mineral + 30	48,25	5,83	37,85	25,95	47,50
N-mineral + 60	46,15	6,55	39,43	24,25	42,78
<i>Riz</i> + 30	47,75	7,45	36,85	24,45	43,30
<i>Riz</i> + 60	45,55	5,53	38,28	23,73	44,98
<i>Azo</i> + 30	47,78	6,30	33,43	22,75	39,73
<i>Azo</i> + 60	46,70	6,40	37,80	22,30	42,05
<i>Cal</i> + 30	49,40	7,43	40,70	27,70	41,88
<i>Cal</i> + 60	46,28	7,15	40,03	27,80	44,60
<i>Ana</i> + 30	46,33	6,50	40,0	26,33	42,85
<i>Ana</i> + 60	49,60	6,53	41,60	25,13	44,43

Riz + Azo + 30	48,30	7,53	38,63	24,63	45,20
Riz + Azo + 60	42,13	6,70	40,35	25,75	42,33
Riz + Cal + 30	46,60	6,20	28,90	23,70	39,10
Riz + Cal + 60	47,03	6,28	35,25	20,23	45,30
Riz + Ana + 30	47,15	7,13	40,05	24,78	39,80
Riz + Ana + 60	51,88	7,88	48,18 *	33,34 *	40,88
Azo + Cal + 30	50,30	6,13	43,35	28,30	43,90
Azo + Cal + 60	47,25	6,50	44,75	29,18	42,08
Azo + Ana + 30	43,08	5,90	42,83	27,63	39,88
Azo + Ana + 60	45,20	5,43	43,75	28,30	44,13
Riz + Azo + Cal + 30	47,02	6,80	44,98	30,35 *	41,83
Riz + Azo + Cal + 60	43,68	7,33	40,88	25,75	41,83
Riz + Azo + Ana + 30	46,08	7,0	41,93	30,58 *	40,60
Riz + Azo + Ana + 60	48,30	8,63 *	43,73	27,35	40,70

Onde Riz (*Rhizobium*), Ab (*Azospirillum brasilense*), Cb (*Calothrix brevissima*) e Ac (*Anabaena cylindrica*). \*- significativo a 5% pelo teste de Dunnet.

Tabela 17. Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com *Rhizobium*, *A. brasilense* e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para número de vagem por planta (NVP), número de grão por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) na 2ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019.

Tratamento + N (kg ha <sup>-1</sup> )	NVP	NGV	PMG (g)	PG
	— (n <sup>o</sup> .)	—	(g)	(kg ha <sup>-1</sup> )
Controle	13,10	4,5	220,68	2792
N-mineral + 30	14,00	4,8	219,30	2649
N-mineral + 60	13,50	4,6	217,73	2843
Riz + 30	14,95	4,3	210,68	2849
Riz + 60	14,03	4,5	218,65	3010
Azo + 30	15,70	4,4	214,88	2933
Azo + 60	13,45	4,4	215,93	2521
Cal + 30	15,38	4,6	215,90	2622
Cal + 60	16,60	4,8	223,55	2599
Ana + 30	14,25	4,5	221,95	2944
Ana + 60	15,85	4,0	229,90	2925
Riz + Azo + 30	14,68	4,6	221,68	3126
Riz + Azo + 60	16,30	4,7	229,90	3080
Riz + Cal + 30	15,95	3,6	219,38	2954
Riz + Cal + 60	17,78	4,6	227,15	3479
Riz + Ana + 30	14,63	4,3	222,30	2779
Riz + Ana + 60	16,20	4,3	228,30	3298
Azo + Cal + 30	15,83	4,3	210,73	2815
Azo + Cal + 60	15,80	5,3	223,30	3247
Azo + Ana + 30	16,23	4,3	219,70	3053

Azo + Ana + 60	15,53	4,7	221,85	2965
Riz + Azo + Cal + 30	13,55	4,5	219,63	2914
Riz + Azo + Cal + 60	15,25	4,3	225,80	2914
Riz + Azo + Ana + 30	15,53	4,3	230,01	3114
Riz + Azo + Ana + 60	15,65	3,7	223,25	2763

Onde Riz (*Rhizobium*), Ab (*Azospirillum brasilense*), Cb (*Calothrix brevíssima*) e Ac (*Anabaena cylindrica*).

Tabela 18. Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com *Rhizobium*, *A. brasilense* e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para altura de plantas (AP), altura de inserção de primeira vagem (AIV), massa seca total (MST), massa seca foliar (MSF), teor de N foliar (TN), na 1ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019.

Tratamento + N (kg ha <sup>-1</sup> )	AP	AIV	MST	MSF	TN
	_____ (cm) _____	_____ (g 4 plantas <sup>-1</sup> ) _____	_____ (g/kg)		
Controle	64,75	7,83	45,25	25,25	31,58
N-mineral + 30	60,63	10,50 *	95,70 *	42,25 *	52,50 *
N-mineral + 60	60,40	10,48 *	100,88 *	43,60 *	47,78 *
Riz + 30	54,13 *	10,25	87,55 *	41,20 *	45,80 *
Riz + 60	57,20	11,20 *	96,70 *	43,08 *	49,98 *
Azo + 30	54,50 *	11,63 *	95,88 *	42,15 *	42,23
Azo + 60	50,50 *	11,34 *	86,23 *	39,33 *	41,05
Cal + 30	49,75 *	10,34 *	71,93 *	35,28 *	44,38
Cal + 60	49,50 *	10,53 *	77,65 *	37,23 *	44,60 *
Ana + 30	51,75 *	11,01 *	88,58 *	42,05 *	40,35
Ana + 60	52,25 *	10,63 *	69,80 *	35,13 *	46,93 *
Riz + Azo + 30	51,50 *	10,80 *	101,60 *	49,48 *	45,45 *
Riz + Azo + 60	55,50 *	10,85 *	96,63 *	44,08 *	41,58
Riz + Cal + 30	57,00	11,60 *	82,95 *	39,68 *	44,10
Riz + Cal + 60	57,20	11,93 *	100,55 *	46,58 *	42,80
Riz + Ana + 30	58,25	10,90 *	101,48 *	49,05 *	44,80 *
Riz + Ana + 60	59,25	10,75 *	101,85 *	48,38 *	44,63 *
Azo + Cal + 30	58,00	11,40 *	89,43 *	40,70 *	46,65 *
Azo + Cal + 60	58,10	11,98 *	98,00 *	46,33 *	43,33
Azo + Ana + 30	59,25	11,63 *	99,89 *	48,25 *	44,23
Azo + Ana + 60	56,25 *	10,15	76,80 *	37,60 *	50,88 *

Riz + Azo + Cal + 30	55,50 *	11,50 *	115,45 *	53,30 *	47,93 *
Riz + Azo + Cal + 60	57,00	11,23 *	70,98 *	37,48 *	45,98 *
Riz + Azo + Ana + 30	62,00	11,05 *	116,75 *	56,70 *	48,23 *
Riz + Azo + Ana + 60	62,25	11,83 *	82,15 *	39,98 *	50,25 *

Onde Riz (*Rhizobium*), Ab (*Azospirillum brasilense*), Cb (*Calothrix brevíssima*) e Ac (*Anabaena cylindrica*). \*- significativo a 5% pelo teste de Dunnet.

Tabela 19. Contrastes entre médias dos tratamentos inoculados e coinoculados com *Rhizobium*, *A. brasilense* e cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em comparação ao tratamento controle (sem inoculação e sem adubação) para número de vagem por planta (NVP), número de grão por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) na 1ª época de semeadura do feijão comum, Londrina-PR, 2019.

Tratamento, N (kg ha <sup>-1</sup> )	NVP	NGV	MMG	PG
	(n <sup>o</sup> )		(g)	(kg ha <sup>-1</sup> )
Controle	13,25	5,43	217,40	2170
N-mineral + 30	14,98	5,75	216,10	2819
N-mineral + 60	15,15	5,63	231,45	2700
Riz + 30	13,35	6,10	216,43	2970
Riz + 60	15,25	5,80	214,38	2711
Azo + 30	16,85	5,40	217,03	2670
Azo + 60	14,23	5,53	219,25	2159
Cal + 30	15,03	5,76	212,53	3000
Cal + 60	15,83	5,60	210,73	2907
Ana + 30	16,50	5,60	220,73	2648
Ana + 60	14,90	5,30	221,73	3033
Riz + Azo + 30	17,40	5,33	216,25	3204
Riz + Azo + 60	19,18 *	5,78	212,43	2252
Riz + Cal + 30	16,13	5,68	215,28	3256
Riz + Cal + 60	16,83	5,35	217,65	2596
Riz + Ana + 30	15,93	6,23	216,78	2665
Riz + Ana + 60	17,40	6,18	210,70	2815
Azo + Cal + 30	18,13	5,63	211,65	2511
Azo + Cal + 60	15,18	5,30	212,75	2344
Azo + Ana + 30	15,53	5,65	217,70	2685
Azo + Ana + 60	16,55	5,78	220,05	2678
Riz + Azo + Cal + 30	14,98	5,10	219,78	2294
Riz + Azo + Cal + 60	16,53	6,05	224,95	3009
Riz + Azo + Ana + 30	16,05	6,00	212,88	3163
Riz + Azo + Ana + 60	22,05 *	6,03	211,80	2959

Onde Riz (*Rhizobium*), Ab (*Azospirillum brasilense*), Cb (*Calothrix brevíssima*) e Ac (*Anabaena cylindrica*). \*- significativo a 5% pelo teste de Dunnet.

Na 2ª época de semeadura do feijão comum verificaram-se incrementos de produtividade de grãos para a coinoculação com Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (688 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de feijoeiro), Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (507 kg ha<sup>-1</sup> de grãos) e Azo + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (456 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), em relação ao controle (Tabela 20). Na 1ª época, ganhos acima de 700 kg foram observados com a inoculação de *A. cylindrica* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (830 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), *C. brevíssima* + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> (830 e 737 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respectivamente), *Rhizobium* + 30 kg N ha<sup>-1</sup> (800 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), e coinoculação com Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup> (1085 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), Riz + Azo + Ana + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> (993 e 788 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respectivamente) e Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (839 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), em relação ao controle.

Tabela 20. Incremento de produtividade do feijão comum inoculado e coinoculado com *Rhizobium*, *A. brasilense* e Cianobactérias associados à duas doses de N em cobertura em relação ao tratamento controle, em duas épocas de semeadura, Londrina-PR, 2019.

Inoculação	Doses de N	1ª Época		2ª Época	
		(kg ha <sup>-1</sup> )	Incremento (kg ha <sup>-1</sup> )	(kg ha <sup>-1</sup> )	Incremento (kg ha <sup>-1</sup> )
Controle	0	2170	-	2792	-
	30	2819	648	2649	-142
N-mineral	60	2700	530	2843	51
	30	2970	800	2849	57
Riz	60	2711	541	3010	218
	30	2670	500	2933	141
Azo	60	2159	-11	2521	-270
	30	3000	830	2622	-169
Cal	60	2907	737	2599	-192
	30	2648	478	2944	153
Ana	60	3033	863	2926	134
	30	3204	1033	3126	335
Riz + Azo	60	2252	81	3080	288
	30	3256	1085	2954	162
Riz + Cal	60	2596	426	3479	688
	30	2665	494	2780	-12
Riz + Ana	60	2815	644	3298	507
	30	2511	341	2815	24
Azo + Cal	60	2344	174	3247	456
	30	2685	515	3053	261

	60	2678	507	2965	173
Riz + Azo + Cal	30	2294	124	2914	122
	60	3009	839	2914	122
Riz + Azo + Ana	30	3163	993	3114	322
	60	2959	789	2763	-29

Onde Riz (*Rhizobium*), Ab (*Azospirillum brasilense*), Cb (*Calothrix brevissima*) e Ac (*Anabaena cylindrica*).

O incremento das produtividades alcançadas com a inoculação e coinoculação das estirpes de rizóbio (*R. tropici* + *R. freire*), *A. brasilense*, *A. cylindrica* e *C. brevissima* demonstrou o potencial dessa prática à produção do feijão comum com maior destaque na 1ª. época de semeadura. Na natureza, muitos microrganismos coexistem no ambiente, havendo vários tipos de interações microbianas conhecidas, como antagonismo, competição e simbiose. Estes resultados podem ser atribuídos também à outros fatores que não somente a produção de substâncias promotoras do crescimento, tais como a capacidade de tolerar certos tipos de patógenos, solos com teores tóxicos de vários elementos, sendo nutrientes ou não (FUKAMI et al., 2018), alteração da atividade metabólica através de efeitos nas membranas celulares (BASHAN et al., 2004; PALACIOS et al., 2018), aumento da tolerância da planta contra estresses ambientais, além de solubilização de fosfatos e até mesmo com a fixação biológica de N (GRAY; SMITH, 2005).

Em contrapartida, vale ressaltar que dependendo da forma com que as bactérias promotoras do crescimento são adicionadas ao cultivo, sua eficiência pode ser prejudicada, muitas vezes por estarem associadas livremente à planta (rizosfera e/ou interior dos tecidos vegetais), o que as tornam vulneráveis a mudanças ambientais (GYANESHWAR et al., 2002), bem como a relação entre genótipo e estirpe (REIS et al., 2000; INIGUEZ et al., 2004).

Por outro lado, o fornecimento de N via adubação mineral de cobertura geralmente está associado às maiores produtividades (PICAZEVICZ et al., 2017). Conforme pode ser observado no presente estudo, juntamente com a coinoculação de rizóbio com *A. brasilense* e cianobactérias, a aplicação de 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> via fertilizante mineral potencializou o aumento da produtividade do feijão. Além dos benefícios do N citados anteriormente, a resposta proporcionada pela adubação nitrogenada no desenvolvimento das plantas como um todo pode também estar

associada ao fato do N estar diretamente relacionado ao processo de crescimento vegetal, participando da constituição de vários compostos do metabolismo, como proteínas, enzimas e coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos e pigmentos fotossintéticos (BULL, 1993). Concomitante a este fato, o N ainda beneficia o crescimento do sistema radicular, proporcionando à planta, maior capacidade de absorção de água e nutrientes (RAO et al., 1992).

O uso de cianobactérias como biofertilizantes é uma prática bem conhecida nas lavouras, principalmente no cultivo do arroz (RENUKA et al., 2018). Portanto, pesquisas envolvendo a inoculação de cianobactérias em leguminosas são promissoras e há resultados que mostram efeitos positivos dessa inoculação, principalmente quando associados a bactérias promotoras de crescimento de plantas e fixadoras de N. Andrade et al. (2014) relataram que a coinoculação de cepas de cianobactérias (IPR-7061 e IPR-7059) com *R. tropici* (SEMIA 4077 = CIAT899) no feijoeiro, com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) na soja (*Glycine max* (L.) Merrill), ou com *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA 6144) em amendoim (*Arachis hypogaea*) aumentou o número de nódulos, o peso dos nódulos e a produção de grãos em plantas em experimentos de campo. Horácio et al. (2020), avaliando a coinoculação com rizóbio (*R. tropici* + *R. freire*), *Azospirillum* e cianobactérias da espécie *A. cylindrica* em feijão comum, observaram maior número de grãos por planta, peso de cem grãos e peso de grãos por planta, em condições de casa de vegetação. Pacheco et al. (2020), avaliando diferenças na contribuição da fixação biológica de nitrogênio para o desempenho produtivo de cultivares de feijão pela técnica de abundância natural  $^{15}\text{N}$ , observaram que as plantas de feijoeiro dependentes de FBN foram capazes de alcançar altas produtividades, muito próximas às plantas supridas com alta taxa de N-fertilizante, na dose de  $90 \text{ kg N ha}^{-1}$ , usando a ureia).

A coinoculação de rizóbio com *A. brasilense* e outros microrganismos é uma das maiores fronteiras da tecnologia e talvez seja a principal área para futuras aplicações em grandes culturas (PALACIOS et al., 2018). Esta prática vem como mais uma ferramenta a ser utilizada para potencializar os efeitos dos fertilizantes e respostas das plantas a eles ou mesmo em reduzir os custos com fertilizantes no sistema produtivo.

Resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram benefícios da coinoculação das cianobactérias *A. cylindrica*, *C. brevíssima* com rizóbio e *A. brasilense*, com

maior destaque a dose de 30 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura para o incremento da produtividade do feijão, principalmente na 1ª época de semeadura do feijão. Porém, novos estudos são necessários tendo em conta as condições ambientais de cultivo, experimentos com outras cultivares, estirpes de rizóbio e doses crescentes da adubação nitrogenada em cobertura, para avaliar o potencial das cianobactérias associadas ou de forma isolada.

## 5.1 CONCLUSÃO

A 1ª época de semeadura apresentou maior crescimento e desenvolvimento das plantas de feijão quando coinoculadas, contribuindo para aumentos acima de 700 kg ha<sup>-1</sup> de grãos nos tratamentos em coinoculação de Riz + Cal + 30 kg N ha<sup>-1</sup> (1085 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), Riz + Azo + Ana + 30 e 60 kg N ha<sup>-1</sup> (993 e 788 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, respectivamente) e Riz + Ana + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (839 kg ha<sup>-1</sup> de grãos) em comparação ao tratamento controle. Já na segunda safra observaram-se ganhos menores com a coinoculação de Riz + Cal + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (688 kg ha<sup>-1</sup> de grãos), Riz + Ana + 60 kg N ha<sup>-1</sup> (506,7 kg ha<sup>-1</sup> de grãos) e Azo + Cal + 60 kg ha<sup>-1</sup> (com 456 kg ha<sup>-1</sup> de grãos).

A associação de rizóbio, *A. brasilense* e cianobactérias com as doses de N utilizadas em cobertura mostrou-se prática agronômica eficiente para o feijoeiro em condições tropicais.

## 5.2. CONCLUSÕES GERAIS

As características avaliadas na cultura do milho não foram alteradas pela interação entre doses de nitrogênio vs. safra agrícola vs. inoculação, demonstrando que dependendo da safra, as doses de N não interferem na atuação das cianobactérias.

A coinoculação de *A. brasilense* + *A. cylindrica* + *C. brevissima* associadas a 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura favoreceu o desenvolvimento e desempenho produtivo do milho, com incrementos de 1647; 2284 e 1625 kg de grãos de milho, respectivamente, quando comparado ao tratamento não adubado e não inoculado, na safra de 2017/2018.

As massas seca total e massa seca foliar foram alteradas pela interação tripla entre doses de N em cobertura vs. épocas de semeadura vs. inoculação, demonstrando que dependendo de cada época de semeadura, as doses de N interferem na atuação das cianobactérias. As restantes características avaliadas não foram influenciadas pela interação tripla.

Para o feijoeiro, a inoculação com as duas cianobactérias *A. cylindrica* e *C. brevissima* favoreceram o crescimento da planta e incrementos na produtividade de grãos, principalmente em feijão cultivado na primeira época de semeadura, devido ao efeito dos restos da palha de feijão mantidos na mesma área, após a colheita da 2ª época.

No entanto, o uso das cianobactérias como inoculantes pode ser uma alternativa viável para um manejo mais sustentável e equilibrado sem diminuir os níveis de produção e tecnológicos já avançados no milho e no feijão comum.

Assim, torna-se necessário estabelecer mais pesquisas utilizando cianobactérias como inoculante nas cultivares do milho e do feijão comum, com diferentes doses de N em cobertura e em diferentes condições edafoclimáticas, para geração de tecnologias eficientes que possam ser recomendadas de acordo com as diferentes regiões, favorecendo tanto o pequeno quanto o grande produtor.

### 5.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSANO, E. J.; WUTKE, E. B.; BULISANI, E. A. E.; CANTARELLA, H. FEIJÃO. IN: RAIJ, B. VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Eds), **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. p. 194-195, 1997. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas.
- ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Microalgas de águas continentais Potencialidades e desafios de cultivo. Londrina: IAPAR, 1 ed., p. 15-196, 2014.
- ANDRADE, D. S.; MACHINESKI, G. S.; LOVATO, G. M.; COLOZZI, A. F<sup>o</sup>.; GOES, K. C. G. P. DE. Inoculação de microalgas em leguminosas e gramíneas. In D. S., ANDRADE; A. COLOZZI, F<sup>o</sup>. (Eds.), **Microalgas de águas continentais: desafios e potencialidades do cultivo**, v. 2, p. 413-438, 2014.
- ARAÚJO A. P.; TEIXEIRA, M. G. Relationships between grain yield and accumulation of biomass, nitrogen and phosphorus in common bean cultivars. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1977-86, 2008.
- ARF, O.; RODRIGUES, R. A. F.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; NASCIMENTO, V. Manejo do solo, água e nitrogênio no cultivo de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, v. 39, n. 2, p. 131-138, 2004.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BETTIOL, J. V. T. **Produção sustentável do feijão comum: Inoculação, coinoculação e adubação mineral em cultivares de ciclo precoce**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - UNESP, Campus de Jaboticabal.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, p. 399, 2009.
- BREMNER, J.; KEENEY, D. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. **Analytica Chimica Acta**, v. 32, n. 1, p. 482-485. 1965. doi: 10.1016/S0003-2670(00)88973-4.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Marcha de absorção de nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de <sup>15</sup>N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 895-905, 2009.
- BÜLL, L. T. **Nutrição mineral do milho**. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (ed). Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, p. 63-131, 1993.
- CHEKANAI, V.; CHIKOWO, R.; VANLAUWE, B. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across

variable soils in Zimbabwe. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 266, p.167-173, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.010>

COATTI, G. C.; ANDRADE, D. S.; CARDOSO, J. D.; MATOS, M. A. Produção de AIA e diversidade fenotípica de estirpes elite de rizóbio isoladas de feijoeiro-comum. Unopar **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 49-53, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, v.8– Safra 2020/21, n. 5- Quinto levantamento, Brasília, DF, p. 1-94, fevereiro 2021. ISSN 2318 6852.

FAGERIA, N. K. F.; SANTOS, A. B.; STONE, L. F. (2008). **Índices adequados de pH e de saturação por bases na produtividade do feijoeiro em solo de cerrado no Sistema Plantio Direto**. Embrapa Arroz e Feijão. 2008.

FERREIRA, F. A. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A. van (Ed.). **Frijol: investigación y producción**. Cali, Colombia: CIAT, p. 61-78. 1985.

FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. (2018). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, 45:328-339.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395-412. 2005).

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HORÁCIO, E. H.; ZUCARELI, C; ZAMBRANO GAVILANES, F.; YUNES, J. S.; SANZOVO, A. W. S.; ANDRADE, D. S. Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 5, suplemento 1, p. 2015-2028, 2020.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; n. 283).

IDR/IAPAR-Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná/Instituto Agrônômico do Paraná. Cultivares IPR. Disponível em <<http://www.idr.parana.pr.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2021.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p.1078-1085, 2004.

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

MEZIADI, C.; RICHARD, M. M. S.; DERQUENNES, A.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; GRATIAS, A.; PFLIEGER, S.; GEFFROY, V. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence, **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016.

NEVES, M. C. P.; FERNANDES, M. S.; SÁ, M. F. M. Assimilação de nitrogênio em plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 5, p. 689-695, 1982.

PACHECO, R.S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; BRITO FERREIRA, E.P.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A.P. Differences in contribution of biological nitrogen fixation to yield performance of common bean cultivars as assessed by the <sup>15</sup>N natural abundance technique. **Plant and Soil**, 2020.

PALACIOS, O. A.; LOPEZ, B. R.; BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the *Bacterium Azospirillum brasilense*. **Microbial ecology**, 1-13, 2018.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 219-226, 2009.

PETRY, N.; BOY, E; WIRTH, J. P.; HURREL, R. F. The potential of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Vehicle for Iron Biofortification. **Nutrients**, v. 7, p. 1144-1173, 2015.

PICAZEVICZ, A. A.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. D. L. (2017). Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 21: 623-627.

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

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

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 997-1004, 2005.

RAIJ, B. VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

RAO, A. C. S; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. **Fertilizer Research**, v. 33, p. 209-217, 1992.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 3, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2007, 22p. (Documentos 232).

RENUKA, N.; GULDHE, A.; PRASANNA, R.; SINGH, P.; BUX, F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1255-1273, 2018.

SANTOS, A. B. DOS; FAGERIA, N. K. Manejo do nitrogênio para eficiência de uso por cultivares de feijoeiro em várzea tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1237-1248, 2007.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, Embrapa Solos, 5. ed., p. 356, 2018.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v. 38, p. 658-664, 2008.

SCHOSSLER, J. H.; MEERT, L.; RIZZARDI, D. A.; MICHALOVICZ, L. Componentes de rendimento e produtividade do feijoeiro comum submetido à inoculação e coinoculação com estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria**. 17: 10-15, 2016.

SORATTO, R. P.; PEREZ, A. A. G.; FERNANDES, A. M. Age of no-till system and nitrogen management on common bean nutrition and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 106, p. 809, 2014.

SOUZA, C. A.; COELHO, C. M. M.; AMARANTE, C. V. T.; MIQUELLUTI, D. J.; VIEIRA, S. P.; ARCARO, T. F. Proposta para modificar a arquitetura de plantas de

feijão pelo uso de ácido giberélico. **Revista Científica Internacional**, n. 9, p. 1-14, 2009.

SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P. B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 237, p. 250-257, 2017.

TORRES, H. R. M.; RIBEIRO, P. R. C. C.; RIBEIRO, J. J.; produtividade do feijão *Phaseolus vulgaris* L. com aplicações crescentes de molibdênio associadas ao cobalto via foliar. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia-GO, v. 10, n. 18; p. 2468-2481, 2014.

VERONEZI, S. D. F.; COSTA, M. R.; SILVA, A. T.; MERCANTE, F. M. Co-inoculação de rizóbio e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) In: SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL, 4.; ENCONTRO DE PRODUTORES AGROECOLÓGICOS DE MS, 3., 2012, Glória de Dourados. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2012. 1CD-ROM.