

Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 325

**Inoculação com
Azospirillum brasilense:
inovação em rendimento
a baixo custo**

***Mariangela Hungria*
Autora**

Embrapa Soja
Londrina, PR
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, distrito de Warta
Caixa Postal 23, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
Fax: (43) 3371 6100
www.cnpso.embrapa.br
sac@ cnpso.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Renato Bouças Farias
Secretária Executiva: Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Membros: Adeney de Freitas Bueno, Adilson de Oliveira Junior, Clara Beatriz Hoffmann
Campo, Francismar Correa Marcelino, José de Barros França Neto, Maria Cristina Neves
de Oliveira, Mariangela Hungria e Norman Neumaier.

Supervisão editorial: Odilon Ferreira Saraiva
Normalização bibliográfica: Ademir Benedito Alves de Lima

Editoração eletrônica: Vanessa Fuzinatto Dall' Agnol
Fotos da capa: Fábio B. Rui Junior/Embrapa Cerrados e Arquivo Total Biotecnologia

1ª edição

1ª impressão (2011): 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação
dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Soja

Hungria, Mariângela

Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo
custo / Mariangela Hungria. – Londrina: Embrapa Soja, 2011.

36p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325)

1. Bactéria. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Milho. 4. Trigo. I. Título.
II. Série.

CDD 579.323 (21.ed)

© Embrapa 2011

Autora

Mariangela Hungria

Engenheira Agrônoma, Ph.D,
pesquisadora da Embrapa Soja
Londrina, PR
hungria@cnpso.embrapa.br

Apresentação

As projeções são de que, nos próximos anos, haverá um incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. O mercado brasileiro de fertilizantes, porém, é frágil e com grande dependência das importações. É fundamental, portanto, encontrar alternativas para o uso mais eficiente dos fertilizantes e, nesse contexto, alguns microrganismos, como as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, as bactérias promotoras do crescimento de plantas, os fungos micorrízicos, entre outros, podem desempenhar um papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo e com menor dependência de importação de insumos.

Neste documento “Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo” são relatados os estudos pioneiros que resultaram nas primeiras estirpes de *Azospirillum* autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para gramíneas no Brasil. São apresentados resultados de ensaios com as culturas do milho e do trigo, com inoculação com *Azospirillum* e redução substancial na aplicação de fertilizantes nitrogenados. Instruções sobre cuidados com a compra e o uso de inoculantes são detalhados. Novos experimentos estão em andamento para verificar a viabilidade de aplicação da tecnologia em outras gramíneas de grande importância econômica e ambiental e espera-se que os resultados aqui

mostrados subsidiem a adoção crescente da tecnologia, gerando economia para os agricultores e benefícios ambientais para o País.

José Renato Bouças Farias
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

1. O que são bactérias promotoras do crescimento de plantas?	13
2. Bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> promovem o crescimento de plantas?	14
3. O que é a fixação biológica do nitrogênio? <i>Azospirillum</i> também pode realizar esse processo?	14
4. Que outros benefícios às plantas são atribuídos ao <i>Azospirillum</i> ?	16
5. Há muitos ensaios de inoculação com <i>Azospirillum</i> conduzidos no mundo?	17
6. Pode existir especificidade de <i>Azospirillum</i> com as plantas hospedeiras?	18
7. E no Brasil, há muitos estudos básicos e aplicados com <i>Azospirillum</i> ?	18
8. Qual foi a pesquisa que resultou no primeiro inoculante contendo <i>Azospirillum</i> comercializado no Brasil?	19
9. Nessa pesquisa pioneira, quais foram os resultados encontrados com o trigo?	20

10. E qual foi o efeito da inoculação do milho com <i>Azospirillum</i> ?	21
11. Quais foram as repercussões desses ensaios com trigo e milho?	21
12. E no caso de inoculantes líquidos, quais foram os resultados obtidos em trigo e milho?	22
13. Os benefícios pela inoculação com <i>Azospirillum</i> no Brasil são atribuídos à fixação biológica do nitrogênio?	22
14. Rendimentos elevados de milho podem ser obtidos via inoculação com <i>Azospirillum</i> ?	23
15. A partir dos resultados de todos esses ensaios, qual pode ser a recomendação para as culturas do trigo e do milho?	25
16. Existem mais resultados obtidos com diferentes doses de fertilizante nitrogenado em trigo e milho?	26
17. Quais cuidados devem ser tomados com a compra do inoculante contendo <i>Azospirillum</i> ?	28
18. Como deve ser feita a inoculação das sementes com <i>Azospirillum</i> ?	29
Considerações finais	30
Referências	32

Resumo

Existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovem o crescimento e incrementam a produtividade de plantas, devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente. O Brasil tem longa tradição de pesquisa em fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* em associações com gramíneas, mas até recentemente não havia inoculantes comerciais com essas bactérias no País. A Embrapa Soja e a UFPR selecionaram e avaliaram estirpes de *Azospirillum* com as culturas do milho (*Zea mays* L.) e do trigo (*Triticum aestivum* L.), seguindo os protocolos da legislação brasileira. Foram conduzidos nove ensaios em Londrina e Ponta Grossa, avaliando nove estirpes de *Azospirillum* em veículo turfoso. Foram identificadas quatro estirpes para cada cultura, que aumentaram a produção de grãos do milho em 24% a 30% em relação ao controle não inoculado e, em trigo, em 13% a 18%. Em uma segunda etapa, oito ensaios avaliaram as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* em veículo líquido e turfoso e observou-se um aumento médio na produtividade de milho de 26% e de 31% na do trigo. Estudos sobre formulações e aditivos levaram ao desenvolvimento de um inoculante líquido comercial da Embrapa Soja em parceria com a iniciativa privada. Novos ensaios conduzidos pela Embrapa Soja têm confirmado os benefícios pela inoculação de milho e trigo com *Azospirillum* em patamares mais elevados de rendi-

mento. Pode-se concluir que, no caso do trigo cultivado após a soja, a inoculação com a aplicação de 20 kg N ha⁻¹ permite a obtenção de rendimentos de grãos da ordem de 2600 kg ha⁻¹. No caso do milho, a inoculação com a aplicação de apenas 24 kg ha⁻¹ resulta em rendimentos da ordem de 3400 kg ha⁻¹, que são interessantes economicamente no caso de milho safrinha, ou para agricultura familiar.

Com a suplementação adicional de 30 kg ha⁻¹ no florescimento os rendimentos do milho sobem para 7000 kg ha⁻¹. Cuidados na compra e no uso de inoculantes são especificados neste documento. Estima-se que a economia resultante pela inoculação com *Azospirillum* possa ser da ordem de 2 bilhões de dólares por ano. Testes de eficiência agronômica estão sendo conduzidos com outras gramíneas e em co-inoculação com leguminosas.

Palavras-chave: *Azospirillum*, bactérias promotoras do crescimento de plantas, fixação biológica do nitrogênio, inoculação, milho, nitrogênio, trigo.

Abstract

Inoculation with *Azospirillum brasilense*: Innovation in yield at low cost

Interest in the use of inoculants containing bacteria that promote plant growth and increase grain yield is likely to increase in the coming years, due to higher costs of chemical fertilizers, concerns over pollution and emphasis on sustainable agriculture. Although Brazil has a long tradition in research in nitrogen fixation in *Azospirillum*-grass associations, there were no commercial inoculants available on the market. Therefore, Embrapa Soja and UFPR selected and evaluated *Azospirillum* strains for maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) crops, following protocols established by the Brazilian legislature. In a first set of nine trials performed at Londrina and Ponta Grossa, southern Brazil, nine *Azospirillum* strains were evaluated as peat-based inoculants. Four elite strains were identified for each crop. Maize yield was increased by 24 to 30%, in relation to non-inoculated controls, and wheat yield was increased by 13 to 18%. In a second trial set with eight field experiments in Londrina and Ponta Grossa, liquid and peat-based inoculants carrying *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 increased maize and wheat yields by 26 and 31%, respectively. Studies with different formulations and additives led to the development of a commercial liquid inoculant in a partnership between Embrapa Soja and the private sector. New field experiments performed by Embrapa Soja have confirmed the benefits of

inoculation of maize and wheat with *Azospirillum*, resulting increased grain yields. We may conclude that for the wheat grown after soybean the inoculation and 20 kg of N ha⁻¹ at sowing results in yields of about 2600 kg ha⁻¹. For the maize, inoculation and 24 kg of N ha⁻¹ at sowing results in yields of about 3400 kg ha⁻¹; this yield may be of interest for the short season maize and family agriculture. By adding a further supply of 30 kg N ha⁻¹ at flowering, maize yield increases to levels of 7000 kg ha⁻¹. Advice for buying and using inoculants are specified in this document. Estimates are that the saving resulting from replacement of N fertilizers by *Azospirillum* inoculants could be of US\$ 2 billion per year. Tests of agronomic efficiency are in progress for other grasses and for co-inoculation with legumes.

Key words: *Azospirillum*, biological nitrogen fixation, inoculation, maize, wheat, plant growth promoting bacteria.

Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo

Mariangela Hungria

1. O que são bactérias promotoras do crescimento de plantas?

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (Davison, 1988; Kloepper et al., 1989).

As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Huergo et al., 2008); aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (Cassán et al., 2008); produção de hormônios como auxinas, citocininas (Tien et al., 1979), giberilinas (Bottini et al., 1989), etileno (Strzelczyk et al., 1994) e uma variedade de outras moléculas (Perrig et al., 2007); solubilização de fosfato (Rodriguez et al., 2004); e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (Correa et al., 2008).

Em geral, acredita-se que as BPCP beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (Dobbelaere et al., 2003).

2. Bactérias do gênero *Azospirillum* promovem o crescimento de plantas?

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 endófitas facultativas (Döbereiner & Pedrosa, 1987; Huergo et al., 2008). A espécie *Spirillum lipoferum* foi inicialmente descrita por Beijerinck e, em 1978, foi proposta a sua reclassificação como *Azospirillum*, juntamente com a descrição de duas espécies, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (Tarrand et al., 1978); hoje estão descritas 14 espécies no gênero.

Bactérias do gênero *Azospirillum* ganharam grande destaque mundialmente a partir da década de 1970 (Döbereiner & Day, 1976; Döbereiner et al., 1976), com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), da capacidade de fixação biológica do nitrogênio dessas bactérias quando em associação com gramíneas. A propriedade de fixar nitrogênio em vida livre foi responsável pela mudança no nome do gênero *Spirillum* (Tarrand et al., 1978), sendo adicionado o prefixo “azo”, alusivo ao nome utilizado por Lavoisier para denominar o elemento nitrogênio. É curioso mencionar que a palavra “azote” foi dada por Lavoisier por considerar o nitrogênio como um elemento tão inerte que seria “impróprio para manter a vida”. Hoje, porém, sabe-se que o nitrogênio é a base de toda a vida do planeta, por ser constituinte fundamental dos ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas.

3. O que é a fixação biológica do nitrogênio? *Azospirillum* também pode realizar esse processo?

Embora o nitrogênio gasoso (N_2) constitua 78% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza. Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo e o N_2 consegue ser aproveitado por alguns microrganismos (algumas arqueobac-

térias mas, principalmente, bactérias) que ali habitam, graças à ação de enzima chamada dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 e reduzi-lo a amônia, a mesma forma obtida no processo industrial. Essas bactérias, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de N_2 , 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).

Em termos agrícolas, a maior contribuição do processo de fixação biológica do N_2 ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae (= Fabaceae) com bactérias pertencentes a diversos gêneros e que são denominadas, de modo popular e coletivo, como rizóbios. A simbiose com essas bactérias pode ser facilmente identificada, pois estruturas altamente especializadas, chamadas nódulos, são formadas nas raízes das leguminosas, especificamente para o processo de fixação biológica. A evolução da simbiose entre rizóbios e leguminosas data de milhões de anos, por isso, as taxas mais elevadas de fixação biológica são verificadas nessa categoria de simbiose. Como exemplo, no caso da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), taxas superiores a 300 kg de $N\ ha^{-1}\ ano^{-1}$ são observadas no Brasil, conseguindo suprir totalmente as necessidades da planta (Hungria et al., 2007).

No caso das bactérias endofíticas (ex.: *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella* spp., *Azoarcus* spp.) ou associativas (ex.: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp.), o mesmo complexo da dinitrogenase realiza a conversão do N_2 da atmosfera em amônia. Contudo, ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas. Desse modo, deve-se lembrar que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de não-leguminosas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam

fixar nitrogênio, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas em nitrogênio.

4. Que outros benefícios às plantas são atribuídos ao *Azospirillum*?

Na literatura existem vários trabalhos confirmando que *Azospirillum* produz fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas. Tien et al. (1979), por exemplo, verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* eram o ácido indol-acético (AIA), giberilinas e citocininas.

O maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* pode implicar em vários outros efeitos. Já foram relatados incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (ex.: Bashan & Holguin, 1997; Dobbelaere et al., 2001; Bashan et al., 2004). Provavelmente pelo maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas, também há vários relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (Correa et al., 2008).

Em uma revisão recente de trabalhos sobre as respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, Barassi *et al.* (2008) relatam a melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa, maior altura de plantas. Bashan et al. (2006) relatam incremento em vários pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila a, b, e pigmentos fotoprotetivos auxiliares, como violaxantina, zeaxantina, atheroxantina, luteína, neoxantina e beta-caroteno, que resultariam em plantas mais verdes e sem estresse hídrico. Também em ensaios conduzidos por nosso grupo de pesquisa, várias dessas observações foram confirmadas e, como exemplo, na figura 1 podem ser visualizadas a maior produção de raízes, maior altura de plantas e coloração mais verde pelo maior teor de clorofila, resultantes da inoculação com *Azospirillum*.



Figura 1. Efeito da inoculação de milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* no crescimento radicular, coloração verde e altura das plantas em ensaios conduzidos a campo.

5. Há muitos ensaios de inoculação com *Azospirillum* conduzidos no mundo?

Muitos estudos têm demonstrado que o *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de várias espécies de plantas, sendo muitas delas com grande relevância agrônômica e ecológica (ex.: Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Bashan & Holguin, 1997; Bashan et al., 2004).

Em um levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos, Okon & Labandera-Gonzales (1994) relataram que em 60% a 70% dos experimentos foram obtidos incrementos na produtividade devido à inoculação, com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%. Em outro levantamento realizado na Argentina, com 273 ensaios de inoculação com *A. brasilense* em trigo (*Triticum aestivum* L.), em 76% dos casos houve aumento médio na produtividade de 256 kg ha⁻¹;

em milho (*Zea mays* L.), 85% dos casos responderam positivamente, com um aumento médio na produtividade de 472 kg ha⁻¹ (Díaz-Zorita & Fernandez Canigia 2008). Os resultados de outros experimentos conduzidos na Argentina e no Brasil nas últimas décadas foram recentemente compilados e a grande maioria indica benefícios da inoculação com *Azospirillum* no crescimento das plantas e/ou no aumento da produtividade (Cassán & Garcia de Salamone, 2008).

6. Pode existir especificidade de *Azospirillum* com as plantas hospedeiras?

Um fator chave para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* é a seleção de estirpe(s). Ainda que não tenha sido claramente evidenciada especificidade entre as plantas e as bactérias, há relatos indicando alguma afinidade com determinadas espécies (Penot et al., 1992), ou mesmo cultivares (Wani et al., 1985) de plantas. Como exemplo, foram demonstradas interações com plantas de trigo (Caballero-Mellado et al., 1992), milho (Garcia de Salamone et al., 1996) e milheto [*Pennisetum americanum* (L.) K. Shum.] (Bouton et al., 1985).

Avaliar e selecionar estirpes para a inoculação em culturas específicas é, portanto, importante no desenvolvimento de tecnologias para produção de inoculantes com estirpes eficientes de *Azospirillum* para cereais.

7. E no Brasil, há muitos estudos básicos e aplicados com *Azospirillum*?

Conforme já comentado, o Brasil possui uma longa tradição em pesquisa com *Azospirillum* (ex: Döbereiner & Day, 1976; Döbereiner et al., 1976) e, hoje, está entre as lideranças mundiais em pesquisa básica com essas bactérias. Vários ensaios a campo também já foram conduzidos no País, contudo, resultados consistentes e conclusivos sobre a eficiência agrônômica de inoculantes contendo *Azospirillum* não estavam disponíveis. Consequentemente, até recentemente produtos à base de *Azospirillum* não estavam disponíveis no mercado.

8. Qual foi a pesquisa que resultou no primeiro inoculante contendo *Azospirillum* comercializado no Brasil?

Em 1996, a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em Curitiba, estabeleceram uma parceria, através de projetos de pesquisa financiados pela Embrapa e pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para a realização de ensaios de laboratório e testes de eficiência agrônômica de *Azospirillum* a campo. Obedecendo a todos 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 sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo.

No total, 18 experimentos de campo foram realizados. O primeiro conjunto compreendeu nove experimentos, sendo cinco conduzidos em três safras com milho e quatro conduzidos em duas safras com trigo; nesses experimentos foram avaliados inoculantes turfosos contendo somente uma estirpe de *A. brasilense* ou *A. lipoferum*. O segundo conjunto compreendeu quatro experimentos com milho e quatro com trigo, usando uma combinação de duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) em inoculante na formulação turfosa ou líquida.

Os inoculantes foram preparados para ter uma concentração mínima de 10^8 células de *Azospirillum* g^{-1} de inoculante turfoso ou mL^{-1} de inoculante líquido. O inoculante turfoso foi aplicado na dose de 250 g do inoculante 50 kg^{-1} de sementes, e foram adicionados 300 mL 50 kg^{-1} de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v) para aumentar a adesão do inoculante turfoso nas sementes. O processo de inoculação consistiu da aplicação da solução açucarada sobre as sementes, seguida do inoculante turfoso; após agitar, as sementes foram deixadas para secar na sombra por 15 minutos. A estimativa teórica do número de células por semente para o inoculante turfoso foi de 300.000 células semente⁻¹ para o milho e de 30.000 células semente⁻¹ para o trigo. Para

o inoculante líquido, a dose aplicada foi de 150 mL 50 kg⁻¹ de milho e 200 mL 50 kg⁻¹ de trigo. A estimativa teórica do número de células por semente para o inoculante líquido foi de 270.000 células semente⁻¹ para o milho e de 36.000 células semente⁻¹ para o trigo.

Em relação ao N fertilizante, foi fornecida somente uma dose inicial de 20 kg de N ha⁻¹ para o trigo e de 24 kg de N ha⁻¹ para o milho. Sempre foram adicionados controles sem inoculação e sem ou com a dose recomendada de N fertilizante para cada cultura.

9. Nessa pesquisa pioneira, quais foram os resultados encontrados com o trigo?

Considerando a média dos quatro ensaios conduzidos com trigo em Londrina e Ponta Grossa, a inoculação com *Azospirillum* resultou em incremento significativo médio no rendimento de grãos da ordem de 14% (Tabela 1).

É importante considerar, ainda, que, embora recebendo apenas uma dose baixa de N fertilizante, 20 kg de N ha⁻¹, o rendimento médio dos tratamentos inoculados foi de 2653 kg ha⁻¹, enquanto que a média nacional na safra 2009/10 foi de 2428 kg ha⁻¹.

Tabela 1. Efeito da inoculação¹ com estirpes de *Azospirillum* no rendimento (kg de grãos ha⁻¹) de trigo. Segundo Hungria et al. (2010).

Tratamento	Londrina		Ponta Grossa		Média
	Ano 1	Ano 2	Ano 1	Ano 2	
C	2628 b	2366 c	2321 c	2014 c	2332 c
C + N	3193 a	3038 a	2921 a	2524 a	2919 a
Ab-V1	3095 a	2712 b	2762 ab	2201 b	2693 ab
Ab-V3	3019 a	2880 a	2322 c	2101ab	2581 bc
Ab-V4	2929 ab	2680 b	2441 bc	2115 bc	2541 bc
Ab-V5	3040 a	2675 a	2883 a	2225 b	2706 ab
Ab-V6	3222 a	2775 b	2771 a	2252 b	2755 ab
Ab-V8	3014 a	2661 b	2662 ab	2238 b	2644 ab

¹ Tratamentos: C, controle sem inoculação + 20 kg N ha⁻¹ na semeadura; C+N, controle sem inoculação + 20 kg N ha⁻¹ na semeadura + 50 kg N ha⁻¹ no florescimento; inoculação com 250 g de inoculante turfoso 50 kg⁻¹ semente (10⁸ células g⁻¹) + 20 kg N ha⁻¹ na semeadura.

Estatística: Médias de seis repetições e valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$, Duncan).

10. E qual foi o efeito da inoculação do milho com *Azospirillum*?

Considerando a inoculação do milho com as estirpes Ab, o rendimento médio dos tratamentos inoculados foi de 3407 kg ha⁻¹, 24% superior ao do tratamento controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da inoculação¹ com estirpes de *Azospirillum brasilense* (Ab) e *Azospirillum lipoferum* (Al) no rendimento (kg de grãos ha⁻¹) de milho. Segundo Hungria et al. (2010).

Tratamento	Londrina			Ponta Grossa		Média
	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 1	Ano 2	
C	3186 d	2142 c	2980 e	2423 d	2999 c	2746 c
C + N	4390 a	2677 ab	4540 a	3322 a	4102 a	3806 a
Ab-V1	3665 c	2658 ab	3664 cd	2998 abc	3221 bc	3241 b
Ab-V2	3915 bc	2399 bc	3420 de	2990 abc	3223 bc	3189 b
Ab-V4	4482 a	2356 bc	4120 abc	2890 c	3664 ab	3502 ab
Ab-V5	3543 cd	2975 ab	4220 abc	3108 abc	3998 a	3569 ab
Ab-V6	3713 c	2423 bc	4289 ab	3226 ab	4002 a	3531 ab
Ab-V7	3700 c	2350 bc	4106 abc	3119 abc	3763 ab	3408 ab
Al-V1	4460 a		3810 a-d			
Al-V2	4244ab		3980 a-d			

¹ Tratamentos: C, controle sem inoculação + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura; C+N, controle sem N + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura + 80 kg N ha⁻¹ no florescimento; inoculação com 250 g de inoculante turfoso 50 kg⁻¹ semente (10⁸ células g⁻¹) + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura.

Estatística: Médias de seis repetições e valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente (p<0,05, Duncan).

11. Quais foram as repercussões desses ensaios com trigo e milho?

Os resultados apresentados neste estudo resultaram na autorização pelo MAPA das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a produção de inoculantes para a cultura do milho, uma vez que as mesmas resultaram em incrementos no rendimento de grãos de 662 a 823 kg ha⁻¹, ou 24% a 30% em relação ao controle não inoculado.

Para a cultura do trigo, as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V8 foram as mais efetivas, resultando em um incremento na produtividade de 312 a 423 kg ha⁻¹, ou de 13% a 18% em comparação com o controle não inoculado. Essas estirpes foram disponibilizadas pela Embrapa Soja e pela UFPR para as indústrias de inoculantes, sem custo tecnológico. As indústrias têm optado por produzir inoculantes com as estirpes Ab-V5 + Ab-V6, por serem eficazes com as culturas do milho e do trigo.

12. E no caso de inoculantes líquidos, quais foram os resultados obtidos em trigo e milho?

Muitos agricultores dão preferência a inoculantes líquidos, pela facilidade de aplicação. Desse modo, a Embrapa Soja desenvolveu uma formulação líquida que, em uma parceria com a empresa Total Biotecnologia, foi adaptada para fermentadores de grande porte. Cada vez mais é dada importância à parceria pública-privada, permitindo a adaptação da pesquisa à escala industrial e, também, que os benefícios cheguem mais prontamente aos agricultores.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 3, confirmando a viabilidade do inoculante líquido, que resultou em incremento médio no rendimento de grãos de 26% para o milho e de 31% para o trigo. Os rendimentos médios foram de 3905 kg ha⁻¹ para o milho e de 2656 kg ha⁻¹ para o trigo.

Os resultados obtidos com o inoculante líquido desenvolvido pela parceria entre Embrapa Soja e a Total Biotecnologia, contendo *Azospirillum* e moléculas protetoras para as condições tropicais resultou no lançamento, em 2010, de um inoculante. Outras indústrias estão desenvolvendo formulações e fazendo testes de eficiência agrônômica com as mesmas estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

Tabela 3. Efeito da inoculação¹ com *Azospirillum* Ab-V5 + Ab-V6 em formulação à base de turfa ou líquida no rendimento (kg de grãos ha⁻¹) de milho e trigo. Segundo Hungria et al. (2010).

Tratamento	Londrina		Ponta Grossa		Média	Aumento	
	Ano 1	Ano 2	Ano 1	Ano 2		kg ha ⁻¹	%
Milho							
C	3200 c	2980 c	2999 c	3112 b	3073 c		
C + N	4970 a	4540 a	4102 a	4040 a	4413 a	1340	23,6
Ab-V5 + Ab-V6 (turfa)	4125 b	3999 b	3600 b	3980 a	3926b	853	27,8
Ab-V5 + Ab-V6 (líquido)	4028 b	4102 b	3590 b	3899 a	3905 b	832	27,1
Trigo							
C	2142 b	2012 b	2004 b	1999 b	2039 b		
C + N	2677 a	2866 a	2324 a	2884 a	2688 a	649	31,8
Ab-V5 + Ab-V6 (turfa)	2910 a	2777 a	2350 a	2752 a	2687 a	658	32,3
Ab-V5 + Ab-V6 (líquido)	2888 a	2750 a	2345 a	2642 a	2656 a	617	30,3

¹ Tratamentos: C e inoculação, 24 kg N ha⁻¹ na semeadura para o milho e 20 kg N ha⁻¹ para o trigo; C + N, 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 80 kg N ha⁻¹ para o milho e 50 kg N ha⁻¹ no florescimento; inoculação consistindo de 250 g de inoculante turfoso 50 kg⁻¹ semente; com 2.108 células g⁻¹ ou de 3.108 células mL⁻¹ do inoculante líquido.

Estatística: Médias de seis repetições e valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente (p < 0,05, Duncan).

13. Os benefícios pela inoculação com *Azospirillum* no Brasil são atribuídos à fixação biológica do nitrogênio?

O aumento da produtividade devido à inoculação com *Azospirillum* nos ensaios conduzidos no Brasil foi correlacionado não só com o aumento do N, mas também com outros nutrientes, como o P e K, fato também relatado em outros países (ex: Bashan & Holguin, 1997; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004).

Como exemplo, na figura 2 podem ser visualizados os incrementos nos teores de P e K nos grãos de milho em um dos ensaios conduzidos pela Embrapa Soja. Desse modo, os benefícios da inoculação com *Azospirillum* vão além da fixação biológica do nitrogênio, razão pela qual as bactérias são classificadas como promotoras do crescimento de plantas.

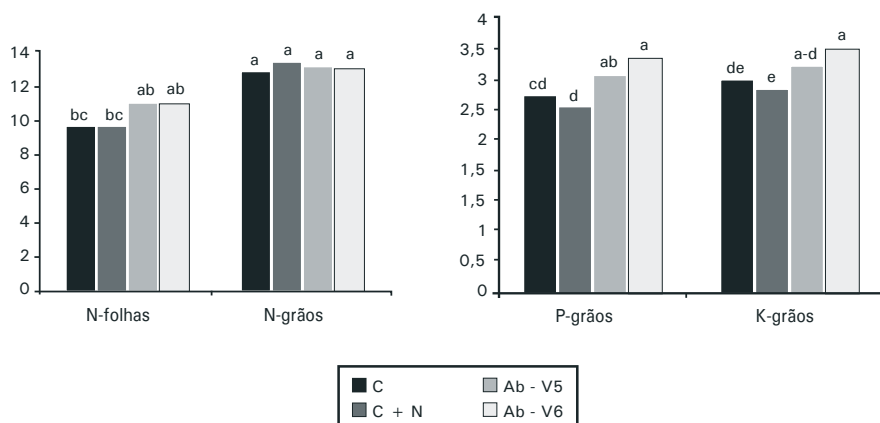


Figura 2. Teor de N nas folhas no florescimento (g kg⁻¹) e teores de N, P e K nos grãos (g kg⁻¹) de milho inoculado ou não com *Azospirillum*.

(Tratamentos: C, controle sem inoculação + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura; C+N, controle sem N + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura + 80 kg N ha⁻¹ no florescimento; inoculação com 250 g de inoculante turfoso 50 kg⁻¹ semente (10⁸ células g⁻¹) + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura.

Estatística: Médias de seis repetições e valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente, $p < 0,05$, Duncan).

Modificado de Hungria et al. (2010), considerando apenas alguns tratamentos.

14. Rendimentos elevados de milho podem ser obtidos via inoculação com *Azospirillum*?

Conforme já comentado, a capacidade de suprimento de N pela inoculação com *Azospirillum* não pode ser comparada àquela observada em leguminosas.

A Embrapa Soja iniciou, então, uma série de ensaios visando estabelecer patamares de rendimento pela combinação de inoculação com *Azospirillum* e adição de fertilizantes nitrogenados.

Na Tabela 4 podem ser visualizados os ganhos no rendimento quando, além da dose de 24 kg N ha⁻¹ na semeadura, foram fornecidos 30 kg N ha⁻¹ no florescimento do milho. Rendimentos superiores a

7000 kg ha⁻¹ foram obtidos com uma dose correspondente a menos de 50% daquela recomendada para a cultura.

Tabela 4. Efeito da inoculação¹ com *Azospirillum* no rendimento (kg de grãos ha⁻¹) de milho. Segundo Mariangela Hungria (dados não publicados)¹.

Tratamento	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Média	Ganho em relação ao C
C	2286 h	2822 i	3080 h	2729 h	-
C+N	7842 a	8081 a	8004 a	7976 a	5247
Ab-V1	3455 g	3444 h	3005 i	3301 g	572
Ab-V2	3915 f	2399 j	3330 g	3215 g	486
Ab-V3	3333 h	4881 f	3337 g	3850 f	1121
Ab-V4	7585 b	6886 d	7110 d	7194 b	4465
Ab-V5	7793 a	7012 c	7331 b	7379 b	4650
Ab-V6	7390 c	6111 e	7189 c	6897 c	4168
Ab-V7	6867 e	4333 g	5702 e	5634 e	2905
AI-V2	7211 d	7223 b	7126 d	7187 b	4458
AI-V1	7334 c	7015 c	3980 b	6110 d	3381

¹ Tratamentos: C sem inoculação + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura para o milho e 30 kg N ha⁻¹ no florescimento; C+N, controle sem inoculação + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura + 80 kg N ha⁻¹ no florescimento; inoculação com 250 g de inoculante líquido (10⁸ células mL⁻¹) do inoculante líquido + 24 kg N ha⁻¹ na semeadura + 30 kg N ha⁻¹ no florescimento.

Estatística: Médias de seis repetições e valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$, Duncan).

15. A partir dos resultados de todos esses ensaios, qual pode ser a recomendação para as culturas do trigo e do milho?

No caso do trigo, os ensaios sempre foram feitos após a cultura da soja. Sabe-se que uma soja bem inoculada e fixando N₂ pode deixar cerca de 30 kg N ha⁻¹ para a cultura seguinte (Hungria et al., 2007). Desse modo, a inoculação com a aplicação de cerca de 20 kg N ha⁻¹ permite a obtenção de rendimentos da ordem de 2600 kg ha⁻¹. Historicamente a cultura do trigo tem apresentado baixo retorno econômico ao agricultor. Caso a conjuntura econômica esteja favorável, a adição complementar de N deverá ser estudada. Cabe lembrar, ainda, que se o trigo for cultivado após o milho a dose complementar de N fertilizante pode ser maior, uma vez que não existe a contribuição residual da soja.

No caso do milho, a inoculação com a aplicação de apenas 24 kg ha⁻¹ na semeadura resulta em rendimentos da ordem de 3400 kg ha⁻¹, que são interessantes economicamente no caso de milho safrinha, ou para a agricultura familiar. Com a suplementação adicional de 30 kg ha⁻¹ no florescimento é possível alcançar rendimentos da ordem de 7000 kg ha⁻¹ pela inoculação.

Conforme será discutido no item 16, outros estudos com doses de N fertilizante estão sendo conduzidos pela Embrapa Soja.

16. Existem mais resultados obtidos com diferentes doses de fertilizante nitrogenado em trigo e milho?

Na safra 2009/10, a Embrapa Soja iniciou uma série de ensaios com *Azospirillum*, com recursos da própria Embrapa, do MCT/CNPq (Ed 692009 CTAgro Nut-Edital MCT/CNPq/CT-Agro nº 69/2009 - Microrganismos Facilitadores da Nutrição Vegetal, processo 557746/2009-4) e da iniciativa privada (Total Biotecnologia). Em relação à complementação com N fertilizante, estão sendo testadas as doses de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da recomendação para as culturas do trigo e do milho, com e sem inoculação com *Azospirillum*.

A inoculação com *Azospirillum* também está sendo avaliada com outras culturas, como *Brachiaria* spp. e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Também há ensaios para verificar o efeito da co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum* (no sulco e nas sementes) com as culturas da soja e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Finalmente, considerando a indicação de recomendação atual (item 15), foram distribuídos inoculantes para outras unidades da Embrapa (Embrapa Trigo e Embrapa Cerrados), além de ensaios conduzidos com diversos agricultores (do RS, do PR, do MS, do MT) e cooperativas, para a validação da tecnologia em larga escala.

Na figura 3 pode ser visualizado o bom desempenho de milho inoculado com *Azospirillum* em Londrina.

Foto: Mariangela Hungria



Figura 3. Aspecto da parcela com milho inoculado com *Azospirillum* e recebendo apenas 24 kg N ha⁻¹ na semeadura, em ensaio conduzido na safra 2009/10 na Embrapa Soja, Londrina, PR.

A validação em solos de Cerrado tem sido muito importante, uma vez que os ensaios que levaram à identificação das estirpes de *Azospirillum* haviam sido conduzidos na Região Sul. Mas o desempenho do *Azospirillum* no Cerrado tem sido excelente. Na figura 4, por exemplo, podem ser visualizados os efeitos da inoculação com *Azospirillum* em um solo de Cerrado em Planaltina, DF. Também é interessante conferir depoimentos de outras instituições de pesquisa, como a Fundação MS (Entrevista com o Dr. Dirceu L. Broch no Portal Dia de Campo - **Inoculante: cinco sacas a mais por hectare**: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=22767&secao=Pacotes%20Tecnológicos#null;24/09/2010>).

Foto: Fabio B. Reis-Junior



Figura 4. Ensaio com *Azospirillum* conduzido na safra 2009/10 na Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

Os resultados dessa série de ensaios que vêm sendo conduzidos desde a safra 2009/10 serão compilados e mostrados nos próximos anos, uma vez que nossos critérios sobre novas tecnologias exigem, no mínimo, dois anos de experimentação em dois agroecossistemas distintos. Por enquanto, porém, alguns resultados são mostrados na Tabela 5. Além disso, cabe salientar que nos tratamentos que receberam 100% de N fertilizante, em geral o efeito da inoculação com *Azospirillum* foi anulado.

Tabela 5. Rendimento (kg ha⁻¹, médias de seis repetições) de milho e ganhos pela inoculação com *Azospirillum* em ensaios conduzidos no Paraná na safra de verão de 2009/10 e safrinha de 2010. Tratamentos recebendo 50% da dose recomendada de fertilizante nitrogenado para a cultura ou somente uma dose inicial na semeadura. Mariangela Hungria e Leopoldo Sussumu Matsumoto (dados não publicados).

Safra	Local	Inoculação	Rendimento	Diferença
Com 50% da dose recomendada de N-fertilizante				
Verão 2009/10	Londrina	Não	7677	181
		Sim	7858	
Verão 2009/10	Ponta Grossa	Não	7701	472
		Sim	8263	
Safrinha 2010	Campo Mourão	Não	6461	76
		Sim	6537	
Somente com 24 kg de N ha ⁻¹ na semeadura				
Verão 2009/10	Ponta Grossa	Não	7692	51
		Sim	7742	
Safrinha 2010	Santa Mariana	Não	5724	330
		Sim	6054	
Safrinha 2010	Campo Mourão	Não	5636	55
		Sim	5691	

17. Quais cuidados devem ser tomados com a compra do inoculante contendo *Azospirillum*?

1. Verificar se o produto apresenta o número de registro no MAPA, para certificar-se de que a origem e a qualidade são comprovadas e que

o inoculante contém as estirpes recomendadas pela pesquisa;

2. Verificar o prazo de validade do inoculante, que deve constar da embalagem. Jamais comprar inoculante vencido;
3. Certificar-se de que o produto, antes de ser comprado, era conservado em condições adequadas de umidade e temperatura (no máximo 30°C). Após a aquisição, conservar o inoculante em local protegido do sol e arejado até o momento da utilização. Não esquecer de que o inoculante contém seres vivos, sensíveis ao calor
4. Para inoculantes à base de *Azospirillum* a legislação exige uma concentração mínima de 10^8 células g^{-1} ou mL^{-1} de inoculante; e
5. Em caso de dúvida, contactar um fiscal do MAPA.

18. Como deve ser feita a inoculação das sementes com *Azospirillum*?

Hoje, no mercado, só existem inoculantes líquidos para *Azospirillum*. O inoculante líquido pode ser misturado às sementes com tambor rotatório, ou com a máquina de tratamento de sementes, ou outros mecanismos, desde que sejam eficientes na distribuição. É importante salientar que:

1. Tomar cuidado para que a distribuição do inoculante líquido nas sementes seja uniforme;
2. A temperatura na hora da semeadura, ou no depósito de sementes na máquina de semeadura, é crítica. Evitar, ao máximo, deixar as sementes expostas ao sol e redobrar a atenção quanto à temperatura no depósito de sementes;
3. Não se recomenda a inoculação diretamente na caixa semeadora, que dificulta a cobertura uniforme das sementes.
4. Durante a semeadura, se o depósito de sementes na máquina ficar

muito aquecido (temperatura superior a 35°C), deve-se interromper a atividade e resfriar a caixa, pois o calor pode matar as bactérias;

5. Semear imediatamente ou, no máximo, dentro de 24 h após a inoculação;

6. No caso de sementes tratadas com fungicida, inseticidas e/ou micronutrientes, o inoculante deve ser colocado por último e a semeadura deve ser realizada o mais breve possível. Se não for possível semear em 24 h, repetir o processo de inoculação; e

7. Lembrar que o inoculante contém bactérias vivas, sensíveis ao calor, deficiência hídrica e agrotóxicos. Nessas condições, aumentar a dose do inoculante, permitindo maior número de células de *Azospirillum* por semente e semear o mais breve possível.

Hoje o problema mais sério na inoculação da soja é a compatibilidade com fungicidas e outros produtos usados no tratamento de sementes (Hungria et al., 2007). Certamente esse também será o maior desafio na inoculação com *Azospirillum*. Várias pesquisas ainda precisam ser conduzidas para verificar a compatibilidade com os principais agrotóxicos recomendados para as culturas do milho, trigo e outras gramíneas. Uma atenção especial deverá ser dada a estudos de compatibilidade com inseticidas, que são largamente empregados no tratamento de semente de milho.

Considerações finais

As projeções são de que, nos próximos anos, haverá um incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. O mercado brasileiro de fertilizantes, porém, é frágil e com grande dependência das importações, que hoje são responsáveis pelo fornecimento de 73% do nitrogênio, 49% do fósforo e 90% do potássio consumidos. Embora existam planos de instalação de novas indústrias e abertura de novas áreas de exploração de minerais, a situação nos próximos dez

anos é bastante crítica. Desse modo, o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas que aumentem a eficiência de utilização dos fertilizantes, e que aportem nitrogênio via fixação biológica representa uma estratégia viável economicamente, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes.

No Brasil, considerando somente a reposição parcial do fertilizante nitrogenado (50%) requerido por culturas como o milho e o trigo, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio tradicional dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes contendo as estirpes selecionadas de *Azospirillum brasilense* pode resultar em uma economia estimada de US\$ 2 bilhões por ano. Devem ser somados, a isso, os custos que estariam relacionados ao transporte do fertilizante nitrogenado. Também devem ser considerados os benefícios por menor poluição ambiental que resulta da produção e utilização de fertilizantes nitrogenados, bem como pela redução na emissão de gases de efeito estufa. Desse modo, além da economia para os agricultores, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* contribui para o ambiente e pode ser objeto de negociações futuras no comércio de créditos de carbono. As perspectivas também são de que, nos próximos três anos, a eficiência agrônômica da inoculação com *Azospirillum* seja confirmada com outras gramíneas.

Agradecimentos

Desde 2010 os ensaios com *Azospirillum* são parcialmente financiados pelo MCT/CNPq (Edital Microrganismos Facilitadores da Nutrição Vegetal, processo 557746/2009-4). Na Embrapa Soja, o auxílio de José Zucca Moraes, Miguel Pereira de Souza, Rinaldo B. Conceição, Lúgia Maria de O. Chueire e Eduara Ferreira e o apoio dos operários rurais Jorge J. Azevedo, Laércio Volpato, José S. Oliveira e Reginaldo B. dos Santos são essenciais ao andamento das pesquisas. Agradecimento também ao Dr. Marco Antonio Nogueira (Embrapa Soja) e Dr. Ricardo Silva Araújo (Total Biotecnologia) pelas sugestões no documento. M. Hungria é também bolsista de pesquisa do CNPq.

Referências

- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar 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, 2008. p.49-59.
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- 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.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- BOUTON, J.H.; ALBRECHT, S.L.; ZUBERER, D.A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation **Field Crops Research**, v.11, p.131-139, 1985.
- CABALLERO-MELLADO, J.; CARCACO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, v.13, p.243-253, 1992.

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. 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, 2008. p.61-86.

CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. 268 p.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE 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, 2008. p.87-95.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, v.6, p.282-286, 1988.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. 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, 2008. p.155-166.

DOBBELAERE, S.; CROONRNBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABBALLERO-MELLADO, 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, p.871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107- 149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.T. (Ed.) INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, vol. 2. **Proceedings...** Pullman, USA: Washington State University Press, 1976. p.518-538.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464-1473, 1976.

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

GARCIA DE SALAMONE, I.E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.249-256, 1996.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.

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

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-43, 1989.

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.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUIGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.798-803, 1992.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

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

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

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

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

WANI, S.P.; CHANDRAPALAIH, S.; DART, P.J. Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. **Experimental Agriculture**, v.21, p.175-182, 1985.