

Inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*: redução na adubação nitrogenada de cobertura e mitigação na emissão de gases de efeito estufa



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

DOCUMENTOS 450

Inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e
Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*: redução na
adubação nitrogenada de cobertura e mitigação
na emissão de gases de efeito estufa

Mariangela Hungria
Marco Antonio Nogueira

Embrapa Soja
Londrina, PR
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rodovia Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral. Caixa Postal 4006
CEP 86085-981 , Distrito de Warta, Londrina, PR
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja

Presidente
Adeney de Freitas Bueno

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros
França Neto, Liliane Márcia Mertz-Henning,
Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinatto Dall’Agnol

Normalização
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marisa Yuri Horikawa

Foto da capa:
Sandra Brito

1ª edição
PDF digitalizado (2022)

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, Mariangela

Inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 DE Azospirillum brasilense: redução na adubação nitrogenada de cobertura e mitigação na emissão de gases de efeito estufa / Mariangela Hungria, Marco Antonio Nogueira – Londrina : Embrapa Soja, 2022.
36 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 450).

1. Milho. 2. Inoculação. I. Nogueira, Marco Antonio. II. Título. III. Série.

CDD: 579.323 (21.ed.)

Autores

Mariangela Hungria

Engenheira-agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR

Marco Antonio Nogueira

Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR

Apresentação

A expansão da agricultura brasileira, fortalecida a cada ano e ocupando um papel impactante no produto interno bruto nacional, resulta em maiores demandas nutricionais pelas plantas, majoritariamente supridas por fertilizantes químicos. Contudo, esses fertilizantes apresentam limitações: (i) dependência externa, visto que o país importa, atualmente, 85% das necessidades para atender o consumo interno; (ii) preço elevado em moeda estrangeira; (iii) baixa eficiência de uso pelas plantas; (iv) impacto ambiental. O uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas capazes de substituir, parcial ou totalmente, os fertilizantes químicos representa, portanto, uma estratégia chave para a soberania alimentar de nosso país. Há, inclusive, amplo reconhecimento da importância desses microrganismos, consolidado nos Plano Nacional de Bioinsumos (2020), Plano Nacional dos Fertilizantes (2021) e Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária - ABC+ (2021). A demanda pela redução de gases de efeito estufa é crescente em todo o mundo. A economia de apenas 1 kg de N representa uma redução de 10,7 kg de CO₂ equivalente, com benefícios ambientais e econômicos significativos.

Diante desse cenário, em 2011, foi lançado, com grande sucesso, uma primeira Circular Técnica da Embrapa Soja sobre inoculação do milho e do trigo com *Azospirillum brasilense*. Após uma década de resultados consistentes, um novo documento atualizado é publicado, consolidando a recomendação de substituição parcial de fertilizante nitrogenado aplicado em cobertura no milho em até 25%. O documento está em plena consonância com as demandas atuais e futuras da agricultura brasileira, mostrando resultados obtidos em uma década de ensaios a campo nas diversas regiões produtoras do Brasil e que conduzem à tecnologia de redução da adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*. Os resultados aqui mostrados subsidiam a adoção crescente da tecnologia de uso de bioinsumos, gerando economia para os agricultores e benefícios ambientais não apenas para o País, mas para toda a sociedade.

Adeney de Freitas Bueno

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

Resumo	9
Abstract	10
Bactérias promotoras do crescimento de plantas	11
O gênero <i>Azospirillum</i>	12
O processo de fixação biológica do nitrogênio	13
A síntese de fitormônios	14
Outros benefícios proporcionados às plantas pelo <i>Azospirillum</i>	15
Resultados de inoculação de gramíneas com <i>Azospirillum</i> obtidos em outros países	16
Histórico do uso de <i>Azospirillum brasilense</i> nos inoculantes brasileiros.....	17
Processos microbianos e benefícios associados às estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de <i>Azospirillum brasilense</i>	19
Cuidados que devem ser tomados com o inoculante e com o processo de inoculação	27
Benefícios econômicos e ambientais pela inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de <i>Azospirillum brasilense</i>	29
Agradecimentos	31
Referências	31

Resumo

O uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento de plantas tem incrementado expressivamente na última década, em consonância com a busca por uma agricultura produtiva, com maior retorno econômico e sustentabilidade. O Brasil tem longa tradição de pesquisa em fixação biológica de nitrogênio (FBN) na interação *Azospirillum*-gramíneas, mas carecia de inoculantes comerciais com essas bactérias. Há pouco mais de uma década, sob a liderança da Embrapa Soja, foram selecionadas e lançadas as primeiras estirpes comerciais de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho e trigo, com expansão do uso para o arroz, pastagens com braquiárias e coinoculação da soja e do feijoeiro. Duas estirpes de *A. brasilense*, Ab-V5 e Ab-V6, caracterizadas pela capacidade de FBN e, principalmente, pela síntese de fitormônios, passaram a ser usadas com grande sucesso em todo o território nacional, com relatos de diversos benefícios no milho, incluindo maiores índices de crescimento das raízes, da altura de plantas, do teor de clorofila, de nutrientes nos tecidos e grãos, da indução de tolerância e resistência intrínseca a estresses abióticos e bióticos em plantas e de rendimento de grãos. Ainda havia, porém, demanda de pesquisas sobre a possibilidade de substituição da adubação nitrogenada pela inoculação com *A. brasilense*. Foram conduzidos 30 ensaios em uma década, em milho inoculado e não inoculado recebendo 24 kg/ha de N na semeadura e 0, 50, 75 ou 100% de N em cobertura cerca de 35 dias após a emergência, com a dose de 100% correspondendo a 90 kg/ha de N. Incrementos significativos no rendimento de grãos foram constatados em todas as condições edafoclimáticas investigadas. Os resultados obtidos foram conclusivos em indicar incrementos no rendimento de grãos do milho pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* e a viabilidade de substituição de 25% do N fertilizante usado em cobertura, trazendo benefícios econômicos, com menor custo de implantação da cultura e benefícios ambientais, pela redução na emissão de gases de efeito estufa.

Termos para indexação: *Azospirillum*, *Zea mays*, bactérias promotoras do crescimento de plantas, fixação biológica do nitrogênio, inoculação, nitrogênio.

Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6: reduction in topdress nitrogen fertilization and mitigation in greenhouse gas emissions

Abstract

The use of inoculants containing plant growth-promoting bacteria has increased significantly in the last decade, in line with the search for productive agriculture, with greater economic returns and sustainability. Brazil has a long-time research tradition on biological nitrogen fixation (BNF) with the *Azospirillum*-grasses interaction, but there were no commercial inoculants with these bacteria. A little over a decade ago, under the leadership of Embrapa Soja, the first commercial strains of *Azospirillum brasilense* were selected and released for the maize and wheat crops, with expansion of their use to rice, pastures with brachiarias, and co-inoculation of soybean and common bean. Two strains of *A. brasilense*, Ab-V5 and Ab-V6, characterized by the ability of BNF and, mainly, of synthesizing phytohormones, started to be used with great success throughout the national territory, with reports of several benefits, including increased root growth, plant height, chlorophyll content, nutrients in tissues and grains, induction of intrinsic tolerance and resistance to abiotic and biotic stresses in plants, and grain yield. There was, however, demand of research about the possibility of replacing N-fertilizers by inoculation with *A. brasilense*. Thirty trials were carried out in a decade, in inoculated and non-inoculated maize receiving 24 kg/ha of N at sowing and 0, 50, 75 or 100% of N in topdress about 35 days after emergence, with the dose of 100% corresponding to 90 kg/ha of N. Significant increases in grain yield were observed in all investigated soils and climatic conditions. The results obtained were conclusive in indicating increases in maize grain yield with the inoculation of strains Ab-V5 and Ab-V6 of *A. brasilense*, and the viability of replacing 25% of the N-fertilizer used in topdressing, bringing economic benefits, with lower crop implantation costs and environmental benefits related to the reduction of greenhouse gases emissions.

Index terms: *Azospirillum*, *Zea mays*, plant growth-promoting bacteria, biological nitrogen fixation, inoculation, nitrogen.

Bactérias promotoras do crescimento de plantas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas que habitam principalmente o solo e possuem a capacidade de colonizar a rizosfera, rizoplano, filosfera e tecidos internos das plantas, incluindo raízes, nódulos de leguminosas, caule, folhas, frutos e sementes (Compant et al., 2010). As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por meio de diversos processos microbianos, sendo os mais estudados: (i) fixação biológica de nitrogênio (FBN), contribuindo para a nutrição nitrogenada das plantas; (ii) síntese de fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico, desempenhando papéis na divisão e diferenciação celular, impactando o crescimento vegetal, em particular das raízes e conferindo às plantas tolerância a estresses abióticos e bióticos; (iii) solubilização de fontes pouco solúveis de fósforo (P) e potássio (K), aumentando a disponibilidade desses nutrientes; (iv) síntese da enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor do etileno)-deaminase, responsável pela degradação do ACC, transformando-o em α -cetobutirato e amônia, retardando a produção de etileno sob condições de estresses bióticos e abióticos e promovendo desenvolvimento radicular; (v) síntese de sideróforos, que podem facilitar a absorção de nutrientes como o ferro (Fe), contribuir para a solubilização de fosfato de Fe, quelando o Fe e liberando o fosfato, e auxiliar no biocontrole de patógenos; (vi) síntese de biofilmes, favorecendo a sobrevivência sob condições de estresses abióticos e também favorecendo a disponibilidade de nutrientes; (vii) indução de resistência e tolerância intrínseca de plantas a estresses bióticos e abióticos; (viii) diversos mecanismos de biocontrole de patógenos, via síntese de moléculas antibióticas, enzimas líticas, sideróforos, cianeto (Hungria, 2011; Glick, 2012; Fukami et al., 2018a; Santos et al., 2019; Vishwakarma et al., 2020; Santos et al., 2021; Guimarães et al., 2022).

O gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCP de vida livre, de distribuição global, encontrado predominantemente em solos, podendo interagir com as plantas, majoritariamente na rizosfera (Fukami et al., 2018a), mas com relatos ocasionais como endofíticas facultativas (Döbereiner; Pedrosa, 1987).

A espécie *Spirillum lipoferum* foi descrita por Beijerinck em 1925 e, passadas cinco décadas, 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); em outubro de 2022, estão listadas 24 espécies (LPSN, 2020).

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 FBN dessas bactérias quando em associação com gramíneas. A propriedade de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) 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 (N). É curioso que a palavra “azote” foi dada por Lavoisier por considerar o N como um elemento inerte que seria “impróprio para manter a vida”. Hoje, porém, sabe-se que esse elemento representa a base de toda a vida do planeta, por ser constituinte fundamental dos ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Cabe destacar que, sendo bactérias predominantemente rizosféricas, a contribuição da FBN por *Azospirillum* às plantas é modesta em relação à simbiose de rizóbios com leguminosas, raramente superando um quarto das necessidades das plantas, mas representando valores esses de alta relevância para a agricultura.

Na década de 1980 outro pesquisador renomado, Dr. Yakov Okon, da Universidade de Jerusalém, apontava para os efeitos da inoculação com *Azospirillum* em parâmetros radiculares, incluindo comprimento de raízes, área e ramificações radiculares, que seriam atribuídos à síntese de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas (Okon, 1985). O grupo de pesquisa do Dr. Okon já alertava, nessa época, sobre taxas mais rápidas da absorção de N, P e K em plantas inoculadas com *Azospirillum* do que em controles não inoculados, bem como sobre benefícios no crescimento das

plantas submetidas a estresse hídrico (Sarig et al., 1984; Okon, 1985; Okon; Kapulnik, 1986).

Desde esses trabalhos pioneiros, diversos processos microbianos capazes de promover o crescimento de plantas têm sido relacionados com *Azospirillum* spp., associados principalmente à FBN e à síntese de fitormônios, neste último caso trazendo benefícios à absorção de água e nutrientes (Döbereiner; Pedrosa, 1987; Bashan et al., 2004; Baldani; Baldani, 2005; Bashan; De-Bashan, 2010; Fukami et al., 2018a).

O processo de fixação biológica do nitrogênio

Embora o 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 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 arqueobactérias mas, principalmente, bactérias) que ali habitam, graças à ação da enzima chamada dinitrogenase, ou simplesmente nitrogenase, 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 sua classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas, de acordo com o grau de interação com o hospedeiro (Hungria et al., 2007).

Em termos agrícolas, a maior contribuição do processo de FBN ocorre pela interação simbiótica de plantas da família Fabaceae (=Leguminosae) com bactérias pertencentes a diversos gêneros e 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 FBN. A evolução da simbiose entre rizóbios e leguminosas data de milhões de anos, resultando em taxas mais elevadas de FBN nessas interações. Como exemplo, no caso da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], taxas elevadas, da ordem de 200 a 300 kg de N/ha por safra são observadas no Brasil, conseguindo suprir totalmente as necessidades da planta (Hungria et al., 2007; Hungria; Nogueira, 2019).

No caso das bactérias endofíticas (ex.: *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp.) ou associativas (ex.: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp.), a mesma enzima nitrogenase realiza a conversão do N₂ da atmosfera em amônia. Contudo, ao contrário das bactérias simbióticas, essas bactérias excretam somente uma parte do N diretamente para a planta associada. Posteriormente, a mineralização das células bacterianas pode contribuir com aportes adicionais de N para as plantas; contudo, é importante salientar que o processo de FBN realizado 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 tenham a capacidade de FBN, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas.

A síntese de fitormônios

Na literatura existem vários trabalhos confirmando que *Azospirillum* produz fitormônios que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas. Já, no final da década de 1970, Tien et al. (1979) relataram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* eram o ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas. Posteriormente, houve ampla constatação de síntese de fitormônios, incluindo, além das auxinas, citocininas e giberelinas, ácido abscísico e ácido salicílico (Bottini et al., 1989; Fallik et al., 1989; Bashan; De-Bashan, 2010; Fukami et al., 2018a).

O maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* pode implicar em outros benefícios. Há vários relatos de incrementos na absorção de nutrientes e água, resultando em melhor nutrição das plantas e maior tolerância à deficiência hídrica (Bashan et al., 2004; Cohen et al., 2009; Bashan; De-Bashan, 2010; Fukami et al., 2018a; Guimarães et al., 2022).

Outros benefícios proporcionados às plantas pelo *Azospirillum*

É difícil separar os benefícios na promoção do crescimento de plantas oriundos da melhor nutrição de plantas pela FBN daqueles resultantes da facilitação da absorção de água e pelo maior desenvolvimento das raízes. Como resultado da inoculação com *Azospirillum*, outros benefícios são citados com frequência, resultando em plantas mais vigorosas e produtivas e com maior tolerância a estresses abióticos como salinidade (Dobbelaere et al., 2003; Bashan et al., 2004) e maior tolerância a patógenos de plantas (Tortora et al., 2011).

Há relatos de melhoria em parâmetros fotossintéticos, incluindo os teores das clorofilas a e b, e pigmentos fotoprotetivos auxiliares, como violaxantina, zeaxantina, atheroxantina, luteína, neoxantina e β -caroteno, resultando em plantas mais verdes e mais tolerantes ao estresse hídrico, além de maior condutância estomática, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto e maior elasticidade da parede celular (Bashan et al., 2006; Barassi et al., 2008).

A inoculação com *Azospirillum* também favorece a absorção de outros nutrientes, em geral atribuída ao maior sistema radicular (ex: Steenhoudt; Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004). Além disso, há relato de capacidade de solubilizar fontes pouco solúveis de P (Rodriguez et al., 2004).

A variedade de processos microbianos associados a *Azospirillum* que proporcionam benefícios às plantas levou à sugestão da “Hipótese de Mecanismos Múltiplos” (Cassán et al., 2020).

Resultados de inoculação de gramíneas com *Azospirillum* obtidos em outros países

Estudos conduzidos em vários países 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.: Caballero-Mellado et al., 1992; Okon; Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere et al., 2001; Bashan et al., 2004).

Em um levantamento dos ensaios conduzidos nos primeiros 20 anos de pesquisas pioneiras a campo, Okon e 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%, salientando a grande importância que essas bactérias podem trazer ao cenário agrícola global. A seguir, em levantamento de resultados obtidos entre 1994-2001 na Bélgica, Uruguai, México e Israel, a maioria das respostas foi positiva, particularmente em relação ao incremento na absorção de água e nutrientes (Dobbelaere et al., 2001).

Passados alguns anos, em 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; em milho (*Zea mays* L.), 85% dos casos responderam positivamente, com um aumento médio na produtividade de 472 kg/ha (Díaz-Zorita; Fernandez Canigia, 2008). Resultados de outros experimentos conduzidos na Argentina e Brasil foram compilados nessa mesma época por Cassán e Garcia de Salamone (2008), a grande maioria indicando benefícios da inoculação com *Azospirillum* no crescimento das plantas e/ou no aumento da produtividade. Em outro levantamento realizado na América do Sul com milho, foi verificado incremento no rendimento de grãos em 70% dos ensaios (Cassán; Días-Zorita, 2016).

Nesses ensaios conduzidos ao redor do mundo, uma pergunta frequente é referente à especificidade hospedeira. Cabe comentar que, mesmo no caso de interações mais específicas entre bactérias e plantas hospedeiras, como na simbiose soja-*Bradyrhizobium*, genótipos diferem quanto ao potencial de contribuição do processo microbiano (ex: Hungria; Bohrer, 2000). No caso de *Azospirillum*, também há relato de diferenças entre genótipos, por exemplo, em milheto *Pennisetum americanum* (L.) K. Shum (Wani et al., 1985) e mi-

lho (Garcia de Salamone et al., 1996). Contudo, de um modo geral, não há indicações de *Azospirillum* apresentar respostas diferenciais impactantes de acordo com o genótipo. Ao contrário, a constatação é de que *Azospirillum* spp. pode se associar e trazer benefícios à grande maioria das espécies de plantas investigadas (Pereg et al., 2016), superando a diferença entre genótipos dentro de uma espécie. Além disso, *Azospirillum* representa um caso de sucesso também com leguminosas como a soja e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pela coinoculação com rizóbios no Brasil (Hungria et al., 2013). No caso da soja, por exemplo, no curto espaço de cinco anos a tecnologia da coinoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* já era adotada em 25% de toda a área com a cultura no país, com grandes benefícios no rendimento de grãos (Hungria; Nogueira, 2019, 2022; Santos et al., 2021).

Histórico do uso de *Azospirillum brasilense* nos inoculantes brasileiros

Conforme já comentado, o Brasil possui uma longa tradição em pesquisa com *Azospirillum* (ex: Döbereiner; Day, 1976; Döbereiner et al., 1976; Baldani; Baldani, 2005) e hoje está entre as lideranças mundiais em pesquisa básica com essas bactérias. Desde os trabalhos pioneiros, ensaios a campo foram conduzidos no País, contudo, resultados consistentes e conclusivos sobre o uso de *Azospirillum* como inoculante não estavam disponíveis.

Na década de 1990, a publicação de trabalhos mostrando os benefícios da inoculação anual da soja com *Bradyrhizobium*, com forte retorno econômico para os agricultores que adotavam essa prática, aumentou o uso de inoculantes e resultou em demandas por novos microrganismos para as demais culturas incluídas no sistema de produção de soja (Hungria; Nogueira, 2019, 2022). Nesse contexto, em 1996, a Embrapa Soja iniciou no Paraná um processo de seleção e validação de estirpes de *A. brasilense* para as culturas do milho e do trigo. Após oito anos de pesquisas intensivas, que incluíram avaliações em casa de vegetação e em 18 experimentos a campo, os resultados dos ensaios foram conclusivos na indicação dos benefícios proporcionados por estirpes selecionadas. Os resultados foram apresentados e aprovados no fórum específico da RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes

Microbianos de Interesse Agrícola) em 2004 (Hungria, 2004; Hungria, 2011; Hungria; Nogueira, 2019) e as estirpes passaram a compor a lista de autorizadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) em Instrução Normativa (Brasil, 2011).

Os ensaios que levaram à indicação das estirpes de *A. brasilense* foram conduzidos visando, de acordo com a realidade do final da década de 1990, o milho safrinha com menor aporte de insumo e o trigo, no qual o investimento em fertilizantes era baixo. Consequentemente, foi fornecida somente uma dose basal de N-fertilizante na semeadura, consistindo de 24 kg/ha de N para o milho e 20 kg/ha de N para o trigo. Na média dos 18 ensaios conduzidos em Londrina e Ponta Grossa, a inoculação resultou em incrementos médios no rendimento de grãos de 24% no milho e de 19% no trigo, em patamares de rendimento compatíveis com a média nacional no período, de 3.700 e 2.700 kg/ha para o milho e o trigo, respectivamente (Hungria et al., 2010). Os resultados obtidos levaram à recomendação das estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V8 para a cultura do trigo e Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para o milho (Hungria et al., 2010; Brasil, 2011). Como duas estirpes, Ab-V5 e Ab-V6 incrementavam o rendimento das duas culturas, a indústria mostrou interesse em usar essa combinação, abrangendo um mercado mais amplo. Na coleção de culturas de microrganismos da Embrapa Soja, as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 receberam a nomenclatura de CNPSO 2083 e CNPSO 2084, respectivamente. As estirpes foram disponibilizadas para as indústrias e os dois primeiros inoculantes comerciais vieram ao mercado em 2009 para milho e arroz (*Oryza sativa* L.) e, em 2010, para milho e trigo. A seguir, vieram registros para coinoculação da soja e do feijoeiro (Hungria et al., 2013) e pastagens com braquiárias (*Urochloa* spp.) (Hungria et al., 2016). Hoje são comercializadas mais de 10,5 milhões de doses de inoculantes contendo essas estirpes (Santos et al., 2021).

Logo após o lançamento, houve demanda de pesquisa para verificar o desempenho das estirpes visando maiores níveis de produtividade de milho. Resultados a campo indicaram a viabilidade de obtenção de patamares de 6.000 kg/ha no milho com a aplicação, além dos 24 kg/ha de N na semeadura, de 50% da dose de N em cobertura entre 30 e 40 dias após a emergência (Hungria, 2011), e de 8.000 kg/ha com 75% da adubação de cobertura (Fukami et al., 2016).

Processos microbianos e benefícios associados às estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*

Desde o lançamento das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, vários benefícios às plantas têm sido relatados, isoladamente ou em conjunto, resultando em promoção de crescimento e maior rendimento de grãos.

Dentre os benefícios, foi confirmada a capacidade de FBN *in vitro*, em meio de cultura específico, onde há a formação de película típica indicando que a bactéria encontrou a concentração de oxigênio que permite o funcionamento da enzima nitrogenase (Figura 1). A estirpe Ab-V5 apresenta maior capacidade de FBN.

As duas estirpes também se destacam quanto à síntese de fitormônios, tendo sido identificados, *in vitro*, a síntese de ácido indol-3-acético (AIA) e intermediários da sua síntese, ácido salicílico, ácido indol-3-láctico e, em menores proporções, ácido giberélico e ácido jasmônico (Fukami et al., 2017; Fukami et al., 2018b). A estirpe Ab-V6 se destaca como grande produtora de AIA (Fukami et al., 2018b) (Figura 1). A produção, particularmente de AIA, resulta em incrementos impactantes no crescimento das raízes e, consequentemente, das plantas, largamente relatados em vários ensaios. De fato, em uma meta-análise realizada com resultados de 103 ensaios de campo, conduzidos em 54 locais do Brasil, avaliando a inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, foi observado um incremento médio na massa radicular de 12% (Barbosa et al., 2022). Cabe comentar que, em outra meta-análise para verificar o efeito da coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, o incremento médio na massa radicular foi da mesma ordem (Barbosa et al., 2021).



Figura 1. Principais atributos promotores do crescimento de plantas das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*.

Plantas submetidas a estresses abióticos e bióticos têm o metabolismo oxidativo alterado, com a produção de moléculas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*), que incluem radicais superóxido (O_2^-), hidroxilas (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($*OH$), altamente deletérias (Gill; Tuteja, 2010). A atividade de enzimas na planta relacionadas à síntese de antioxidantes representa o principal mecanismo de desintoxicação de ROS, promovendo a tolerância ou resistência intrínseca das plantas aos estresses (Fukami et al., 2018a). Foi demonstrado que a inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aumenta e expressão de genes na planta relacionados à síntese de enzimas com papel chave como antioxidantes, como *APX1*, *APX2*, *CAT1*, *SOD2*, *SOD4*, associados à síntese de ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), respectivamente (Fukami et al., 2017). Além disso, foi confirmado incremento na atividade dessas enzimas nas plantas inoculadas, em adição à diminuição no teor do produto (malondialdeído - MDA) resultante da peroxidação de lipídeos nas raízes (Fukami et al., 2017; Fukami et al., 2018b). A inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 também alterou a síntese de prolina, um osmorregulador, com menores teores nas folhas, bem como da proteína de choque térmico *hsp70*, indicando menor necessidade síntese dessas moléculas em plantas inoculadas, visto que já estavam mais protegidas (Fukami et al., 2017).

Fitormônios também regulam respostas a estresses abióticos e bióticos em plantas e foi demonstrado que as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 induzem resistência de plantas a estresses via incremento nos níveis de ácido salicílico, ácido abscísico e ácido jasmônico, sendo propostas essas três vias de indução (Fukami et al., 2018a; Fukami et al., 2018b).

Em relação a estresse bióticos, um dos mecanismos de mediação de microrganismos ocorre pela indução nas raízes da expressão de genes *pr* (*pathogenis-related*) e as proteínas sintetizadas se espalham sistemicamente na planta, aumentando a defesa contra patógenos, um mecanismo conhecido como resistência sistêmica induzida (Van Loon; Bakker 2005; Fukami et al., 2018a). Em milho, a expressão dos genes *PR1*, *prp2* e *prp4* foi incrementada pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (Fukami et al., 2017; Fukami et al., 2018b).

A ação de um ou mais desses mecanismos citados, metabolismo antioxidante, proteínas de choque térmico, proteínas *PR*, induz à denominada tolerância sistêmica induzida (Fukami et al., 2018a). Interessante, vários mecanismos induzidos na planta pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 também foram verificados com a aplicação de metabólitos dessas duas estirpes isentos de células vivas (Fukami et al., 2017; Fukami et al., 2018b).

O maior crescimento de raízes é, sem dúvida, o efeito mais relatado pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6. Em estudo conduzido com milho visando ampliar o conhecimento do efeito dessas estirpes nas raízes, foram constatados incrementos significativos na massa, volume, comprimento total e no comprimento específico das raízes e, também, no diâmetro de raízes na classe < 0,50 mm, no comprimento dos pelos radiculares e no número de bifurcações radiculares por planta (Hungria et al., 2022). Resultados de pesquisa indicam que o maior comprimento de pelos radiculares e raízes de diâmetro na classe < 0,50 mm beneficiam o acesso aos nutrientes no solo e a eficiência de absorção de nutrientes e água (Hodge, 2004; Haling et al., 2013). No caso das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, a maior absorção de nutrientes já foi indicada nos ensaios que resultaram no lançamento das estirpes para o uso em inoculantes comerciais, com incrementos nos teores de P, K, S, Zn, Mn e Cu nos grãos de milho (Hungria et al., 2010).

No estudo pioneiro com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, houve uma primeira indicação de aumento na eficiência de uso do fertilizante nitrogenado, avaliada

indiretamente pelo teor remanescente de nitrato e amônio no solo (Hungria et al., 2010). A confirmação veio em ensaio com milho em que foram fornecidos 100 kg/ha de N marcado com o isótopo pesado ^{15}N , sendo constatado incremento na recuperação do fertilizante da ordem de 70% no tratamento inoculado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, em comparação com o tratamento não inoculado (Martins et al., 2018). Do mesmo modo, o aumento radicular facilita a absorção de água, resultando em maior a tolerância à seca, conforme observado para as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, quando em coinoculação da soja (Cerezini et al., 2016).

Outros relatos de benefícios pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, alguns dos quais podem ser visualizados na Figura 2, incluem o incremento na altura das plantas, no teor de clorofila, na espessura dos colmos, conferindo tolerância ao acamamento, e maior uniformização das espigas, impactando a qualidade dos grãos.

Fotos A, B e C: Total Biotecnologia; (D) Fábio Bueno dos Reis Junior; (E) Mariângela Hungria



Figura 2. Efeitos da inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* no (A) crescimento das raízes; (B) teor de clorofila; (C) altura das plantas; (D) nutrição nitrogenada; (E) uniformidade das espigas de milho.

Cabe salientar que estudos com microscopia confocal de varredura a laser (Fukami et al., 2017) e de análise do microbioma de raízes de nódulos de soja e feijoeiro coinoculadas com os rizóbios específicos e as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (Bender et al., 2022) confirmam que a atuação dessas duas estirpes na rizosfera ou filosfera, não sendo detectadas endofiticamente.

Para o agricultor, os parâmetros mais relevantes são relacionados ao rendimento de grãos. Nesse caso, o melhor exemplo referente às estirpes Ab-V5 e Ab-V6 é indicado na meta-análise de 103 ensaios conduzidos no Brasil, na qual foi confirmado incremento médio estatisticamente significativo no rendimento de grãos de 5,4%, e de 3,6% no teor de N nos grãos (Barbosa et al., 2022). Os benefícios foram observados em híbridos simples, duplos ou triplos, em variedades precoces e super precoces, transgênicas e não transgênicas. Benefícios foram observados em solos com diferentes teores de matéria orgânica, de <2 a >4%, de textura argilosa, média ou arenosa, sob plantio direto ou convencional, em clima tropical ou subtropical. Conseqüentemente, uma tecnologia amplamente aplicável às condições das áreas cultivadas no território nacional (Barbosa et al., 2022).

Os principais mecanismos microbianos e os respectivos benefícios associados a eles já confirmados em milho inoculado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* podem ser visualizados na Figura 3.

Redução na adubação nitrogenada de cobertura do milho pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*

Na década seguinte à do lançamento das estirpes de *Azospirillum* para o milho, entre as perguntas mais frequentes estava a de viabilidade de redução da adubação nitrogenada de cobertura, o que traria forte impacto econômico para o agricultor.

Para atender a essa demanda, foram conduzidos 30 ensaios de campo ao longo de dez anos, 26 dos quais em primeira safra (Hungria et al., 2022). Foram empregados 12 genótipos comerciais de milho adaptados e mais cultivados aos locais dos ensaios. Em cada local, os tratamentos receberam a mesma adubação com macro e micronutrientes, de acordo com a análise de solo e 24 kg/ha de N na semeadura.

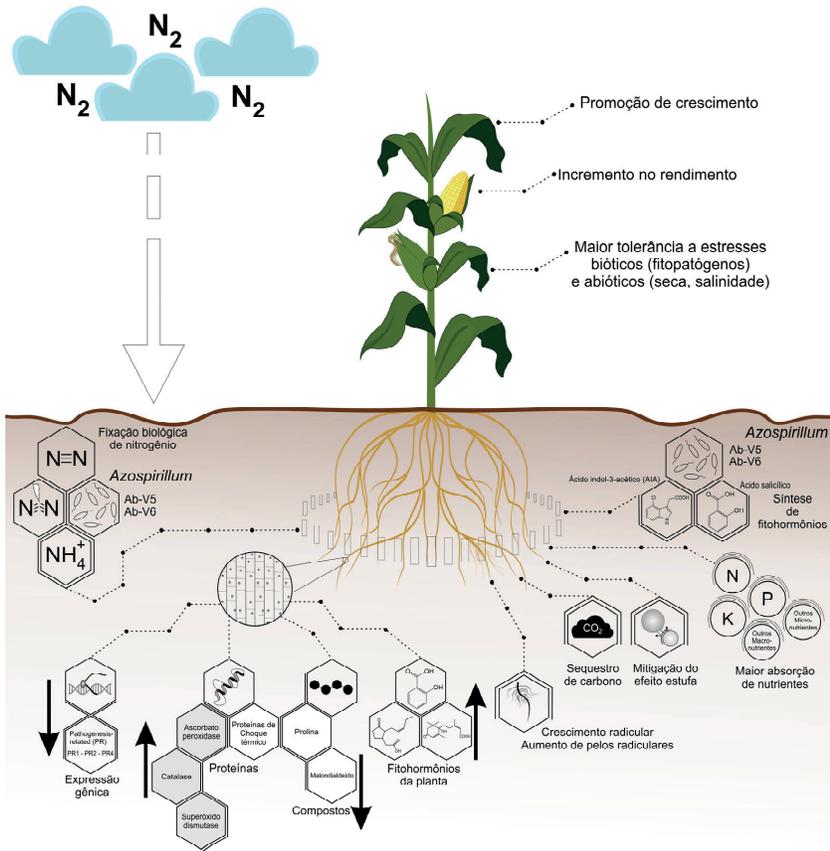


Figura 3. Principais mecanismos promotores do crescimento de plantas confirmados em milho pela inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*.

Na análise de todos os ensaios, independentemente do nível de adubação nitrogenada em cobertura, a inoculação com Ab-V5 e Ab-V6 resultou em incremento médio no rendimento de grãos de 3,1% (Hungria et al., 2022). Incrementos significativos foram confirmados em todas as condições analisadas, de clima subtropical ou tropical, em ampla faixa de rendimento de grãos, em solos argilosos ou arenosos, com diferentes teores de matéria orgânica (Figura 4). Esses resultados indicam que a tecnologia é aplicada às mais diversas condições de cultivo de milho no Brasil.

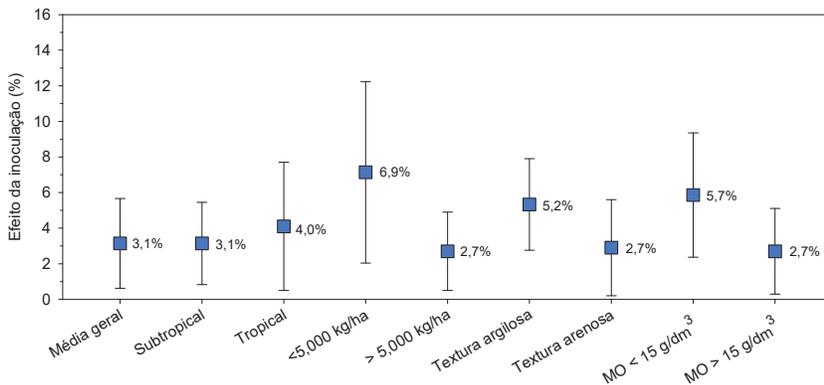


Figura 4. Incremento médio porcentual (\pm intervalo de confiança) no rendimento de grãos de milho, como resultado da inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, em diferentes condições.

Fonte: Hungria et al. (2022).

Em relação à adubação nitrogenada de cultura, incrementos significativos no rendimento foram obtidos em todas as doses estudadas, não sendo significativos apenas no fornecimento de 50% (Figura 5). Concluiu-se que, nessa dose, o N fornecido pode não ter sido suficiente para suprir a demanda necessária para aumentar a produtividade do milho (Hungria et al., 2022). Deve-se destacar, porém, que o maior incremento no rendimento pela inoculação foi obtido somente com o N na semeadura, indicando que a tecnologia pode ser uma ferramenta importante para sistemas de produção com baixo nível de investimento.

O principal resultado do estudo, porém, provavelmente foi o de que, em 26 ensaios que permitiram a comparação do tratamento não inoculado recebendo 100% de N em cobertura com o tratamento inoculado recebendo 75% do N em cobertura, não houve diferença estatística no rendimento de grãos em nenhum dos ensaios (Figura 6). Esse conjunto de dados sólido, obtido nas principais regiões produtoras do Brasil (Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste), em dez anos, permite a recomendação de redução da adubação nitrogenada de cobertura no milho em 25% quando inoculado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*.

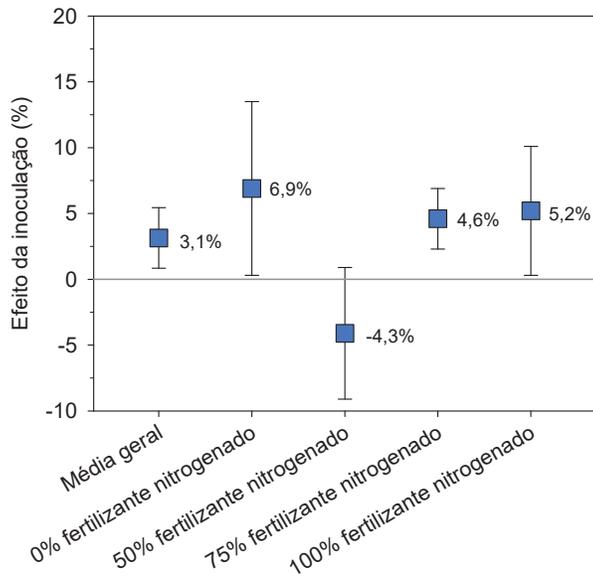


Figura 5. Incremento médio porcentual (\pm intervalo de confiança) no rendimento de grãos de milho, como resultado da inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* e recebendo 24 kg/ha de N na semente e diferentes doses em cobertura ao redor de 35 dias após a emergência, com 100% correspondendo a 90 kg/ha de N em cobertura na forma de ureia.

Fonte: Hungria et al. (2022).

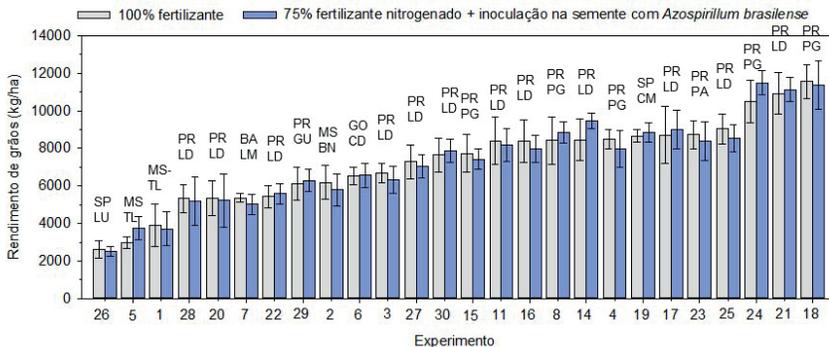


Figura 6. Rendimento de milho em 26 dos 30 ensaios (número do ensaio no eixo X) onde houve a comparação dos tratamentos não inoculado com 100% do N de cobertura e inoculado na semente com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e 75% do N de cobertura. Locais: LU, Lutécia; TL, Três Lagoas; LD, Londrina; LM, Luis Eduardo Magalhães; GU, Guapirama; BN, Bonito; CD, Cachoeira Dourada; PG, Ponta Grossa; CM, Cândido Mota.

Fonte: Hungria et al. (2022).

Cabe salientar que a redução indicada no estudo de Hungria et al. (2022) é referente a uma adubação de 90 kg/ha de N, sendo plausível conseguir reduções percentuais maiores em doses mais elevadas de fertilização, conforme demonstrado em dois ensaios conduzidos em Selvíria, MS, onde foi possível reduzir em 50% a dose de 200 kg/ha de N (Galindo et al., 2019).

Cuidados que devem ser tomados com o inoculante e com o processo de inoculação

Os benefícios pela inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* só serão observados se foram adotadas boas práticas de inoculação, que envolvem cuidados desde a compra até a utilização do inoculante.

Inoculantes

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 que são as 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 de uso. Não esquecer 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 ou mL de inoculante.
5. Em caso de dúvida, contactar um fiscal do MAPA.

Inoculação

A inoculação deve ser feita preferencialmente nas sementes, no momento da semeadura, visando maximizar a contribuição dos processos microbianos pelo maior tempo da cultura. O inoculante pode ser misturado às sementes

em tambor rotatório, ou em máquina de tratamento de sementes, ou outros processos, desde que sejam eficientes na distribuição.

Como alternativa, é possível realizar a inoculação no sulco de semeadura, com equipamento destinado a esse fim. Nesse caso, a dose de inoculante deve ser dobrada.

É importante salientar que:

1. No caso de inoculante turfoso, usar solução açucarada a 10%, para permitir a aderência do inoculante às sementes.
2. Como particularmente a estirpe Ab-V6 é forte produtora de fitormônios, a dose especificada pelo fabricante deve ser rigorosamente seguida, uma vez que o excesso pode, em vez de resultar em importantes incrementos no sistema radicular, inibir o crescimento.
3. Cuidar para que a distribuição do inoculante líquido nas sementes seja uniforme;
4. A temperatura no momento 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.
5. Não se recomenda a inoculação diretamente na caixa semeadora, o que dificulta a cobertura uniforme das sementes.
6. Evitar o aquecimento excessivo no depósito de sementes da máquina, pois o calor pode matar as bactérias.
7. Semear imediatamente ou, no máximo, dentro de 24 h após a inoculação.
8. Não semear “no pó”, pois a sobrevivência de *Azospirillum* no solo depende de umidade e temperaturas amenas no solo. Uma boa cobertura morta na superfície do solo propicia temperaturas mais amenas e menores perdas de água por evaporação.
9. Agroquímicos, em particular agrotóxicos, podem reduzir acentuadamente a sobrevivência do *A. brasilense* nas sementes (Santos et al., 2020); conseqüentemente, em sementes tratadas, realizar a semeadura o mais breve possível, ou optar pela inoculação no sulco.
10. No caso de sementes tratadas com agroquímicos, 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.

11. Na inoculação via sulco de semeadura, não adicionar outros produtos na calda sem antes saber se há compatibilidade com o inoculante, mesmo sendo produtos biológicos. Usar a calda em até 6 h e tentar evitar que a temperatura ultrapasse 32°C durante a aplicação.

Benefícios econômicos e ambientais pela inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*

Na busca por uma agricultura mais sustentável, a tecnologia de inoculação do milho na semeadura com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* propicia redução importante na emissão de gases de efeito estufa. Considerando a dose de 90 kg/ha de N em cobertura, a redução de 25% do N implica em mitigação de 236 kg/ha de equivalentes de CO₂, considerando a taxa de conversão de 1 kg de N=10,5 kg de equivalentes de CO₂.

Em termos econômicos, com preço médio da ureia e do inoculante no mercado em 07/2022, a economia para o agricultor é da ordem de R\$ 260/ha (Figura 7).

A inoculação do milho com *A. brasilense* atende a demandas importantes e atuais da agricultura brasileira, especificadas no Plano Nacional de Bioinsumos (Brasil, 2020), que visa a ampliação do uso de produtos químicos por biológicos; no Plano Nacional dos Fertilizantes (Brasil, 2021), proporcionando maior eficiência de uso dos fertilizantes; e na portaria atual do Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária - ABC+ (Brasil, 2022), contribuindo para a mitigação na emissão de gases de efeito estufa.

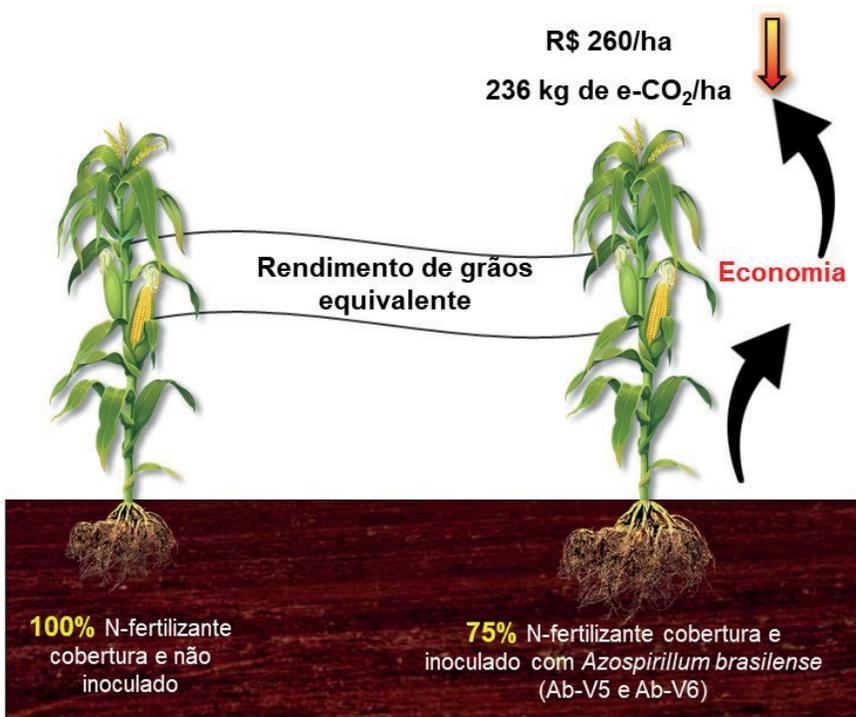


Figura 7. Benefícios econômicos e ambientais pela inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*.

Tecnologia de inoculação de milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*

- Aplicável em ampla variedade de condições edafoclimáticas.
- Permite redução de 25% da adubação nitrogenada de cobertura.
- Aumenta a eficiência de uso dos fertilizantes pelas plantas.
- Diminui a emissão de gases de efeito estufa.
- Aumenta a lucratividade do agricultor.
- Está em consonância com estratégias de agricultura de baixo carbono.
- Modelo de tecnologia para uma agricultura mais sustentável.

Agradecimentos

Em dez anos de ensaios conduzidos na Embrapa Soja, foi fundamental o auxílio da equipe do Laboratório de Biotecnologia do Solo, incluindo alguns aposentados agora: Rinaldo Benedito Conceição, Eduara Ferreira, José Zucca Moraes, Ademar Machado Junior, Lígia Maria de Oliveira Chueire, Renan Augusto Ribeiro e dos operários rurais Reginaldo Brito dos Santos, Fabio Shigueo Sato, Fernandes Pozenato, Sergio Ricardo da Silva, Edilson José da Fonseca, Mauro José Silva, Jorge J. Azevedo, Laércio Volpato e José S. Oliveira.

Grupo de pesquisa apoiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) - Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental - MPCPAgro - (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI 043/2019, CAPES) e pelo Projeto Rede FertBrasil (FINEP 01.22.0080.00).

Referências

- 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**, v. 77, p. 549-579, 2005. DOI: 10.1590/S0001-37652005000300014.
- 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: AAM, 2008. p. 49-59.
- BARBOSA, J. Z.; HUNGRIA, M.; SENA, J. V. S.; POGGERE, G.; REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, 103913, 2021. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.103913.
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. A.; HUNGRIA, M.; CORRÊA, R. S.; MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, 104276, 2022. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104276.
- 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. DOI: 10.1007/s00374-005-0025-x.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth — a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010. DOI: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004. DOI: 10.1139/w04-035.

BENDER, F. R.; ALVES, L. C.; SILVA, J. F. M. da; RIBEIRO, R. A.; PAULI, G.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbiome of nodules and roots of soybean and common bean: Searching for differences associated with contrasting performances in symbiotic nitrogen fixation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 12035, 2022. DOI: 10.3390/ijms231912035.

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. DOI: 10.1104/pp.90.1.45.

BRASIL. **Decreto n. 10.375**, de 26 de maio de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258706480>. Acesso em: 20 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 13**, de 24 de março de 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. Acesso em: 07 out. 2022.

BRASIL. **Portaria MAPA n. 471**, de 10 de agosto de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mapa-n-471-de-10-de-agosto-de-2022-421902518>. Acesso em: 20 set. 2022.

BRASIL. Secretaria Especial de Assuntos Estratégicos. **Plano nacional de fertilizantes 2050**: uma estratégia para os fertilizantes no Brasil. Brasília, DF: SEAE, 2021. Disponível em: <https://static.poder360.com.br/2022/03/plano-nacional-de-fertilizantes-brasil-2050.pdf>. Acesso em: 20 set. 2022.

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. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (ed.) **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: AAM, 2008. 268 p.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; CARLAN, C. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E.; ZORITA, M. D.; DE-BASHAN, L.; MORA, V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 461-479, 2020. DOI: 10.1007/s00374-020-01463-y

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. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.08.020.

CEREZINI, P.; KUWANO, B.; SANTOS, M.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160-167, 2016. DOI: 10.1016/j.fcr.2016.06.017.

COHEN, A. C.; TRAVAGLIA, C. N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, p. 455-462, 2009. DOI: 10.1139/B09-023.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.

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: AAM, 2008. p. 155-166.

DOBBELAERE, S.; CROONRNBOGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-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. DOI: 10.1071/PP01074.

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. DOI: 10.1080/713610853.

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, 2., [1976], Pullman. **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. DOI: 10.1139/m76-217.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison, USA: Science Tech: Springer Verlag, 1987. 155 p. ISBN: 978-3540179696.

FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISCHER, M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 147-153, 1989. DOI: 10.1016/0038-0717(89)90024-2.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018a. DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2016. DOI: 10.1186/s13568-015-0171-y.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; DE LA OSA, C.; VALDERRAMA-FERNÁNDEZ, R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 1191-1203, 2018b. DOI: 10.1007/s00203-018-1535-x.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, p. 153, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0453-7.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZZETTI, S.; PAGLIARI, P. H.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; MEGDA, M. M.; NOGUEIRA, T. A. R.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 4, p. 1985-1997, 2019. DOI: 10.2134/agronj2018.07.0481.

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. DOI: 10.1007/BF00335952.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, Article ID 963401, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

GUIMARÃES, G. S.; RONDINA, A. B. L.; SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Pointing out opportunities to increase grassland pastures productivity via microbial inoculants: attending the society's demands for meat production with sustainability. **Agronomy**, v. 2022, n. 12, 1748, 2022. DOI: 10.3390/agronomy12081748.

HALING, R. E.; BROWN, L. K.; BENGOUGH, A. G.; YOUNG, I. M.; HALLETT, P. D.; WHITE, P. J.; GEORGE, T. S. Root hairs improve root penetration, root-soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3711-3721, 2013. DOI: 10.1093/jxb/ert200.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytologist**, v. 162, p. 9-24, 2004. DOI: <http://www.jstor.org/stable/1514473>.

HUNGRIA, M. Eficiência agrônômica de inoculantes contendo *Azospirillum*, para as culturas do milho e do trigo. In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA (Relare), 12., [2004] Londrina. **Ata...** Curitiba: Relare, 2004.

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

HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Improving maize sustainability with partial replacement of N-fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 114, p. 2969-2980, 2022. DOI: 10.1002/agj2.21150.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000. DOI: 10.1007/s003740050622.

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. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 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. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica do nitrogênio. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. cap. 8, p. 143-162.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: mitos, verdades e desafios. In: **BOLETIM de Pesquisa 2019/2020**. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013. DOI: 10.1007/s00374-012-0771-5.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 221, p. 125-131, 2016. DOI: 10.1016/j.agee.2016.01.024.

LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. [2020]. Disponível em: <https://www.bacterio.net/>. Acesso em: 06 out. 2022.

MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; REIS, V. M.; DÖWICH, I.; POLIDORO, J. C.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. B.; URQUIAGA, S. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1, p. 239-250, 2018. DOI: 10.1007/s11104-017-3193-1.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 223-228, 1985. DOI: 10.1016/0167-7799(85)90012-5.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, p. 3-16, 1986. DOI: 10.1007/BF02277383.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994. DOI: 10.1016/0038-0717(94)90311-5.

PEREG, L.; LUZ, E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, p. 389-414, 2016. DOI: 10.1007/s11104-015-2778-9.

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. DOI: 10.1007/s00114-004-0566-0.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, p. 205, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0932-0.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 0200128, 2021. DOI: 10.36783/18069657rbcs20200128.

SANTOS, M. S.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Compatibility of *Azospirillum brasilense* with pesticides used for treatment of maize seeds. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, Article ID 8833879, 2020. DOI: 10.1155/2020/8833879.

SARIG, S.; KAPULNIK, Y.; NUR, I.; OKON, Y. Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* to *Azospirillum* inoculation. **Experimental Agriculture**, v. 20, n. 1, p. 59-66, 1984. DOI: 10.1017/S0014479700017592.

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. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x.

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. DOI: 10.1139/m78-160.

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. DOI: 10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 2011. DOI: 10.1007/s00203-010-0672-7.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z. A. (ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 39-66.

VISHWAKARMA, K.; KUMAR, N.; SHANDILYA, C.; MOHAPATRA, S.; BHAYANA, S.; VARMA, A. Revisiting plant-microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 560406, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.560406.

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. DOI: 10.1017/S001447970001245X.

Embrapa

Soja

Apoio

