

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS CERES  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IRRIGAÇÃO NO CERRADO

**COMPATIBILIDADE DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*  
COM PESTICIDAS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE  
SEMENTES DE MILHO**

AUTORA: RAQUEL RODRIGUES MÁXIMO DE SOUZA  
ORIENTADOR: DR. WESLEY DE MELO RANGEL  
COORIENTADORA: DRA. PRISCILA JANE ROMANO GONÇALVES SELARI

CERES - GO  
FEVEREIRO, 2024

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS CERES  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IRRIGAÇÃO NO CERRADO

**COMPATIBILIDADE DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*  
COM PESTICIDAS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE  
SEMENTES DE MILHO**

AUTORA: RAQUEL RODRIGUES MÁXIMO DE SOUZA  
ORIENTADOR: DR. WESLEY DE MELO RANGEL  
COORIENTADORA: DRA. PRISCILA JANE ROMANO GONÇALVES SELARI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Irrigação no Cerrado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Ceres, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM IRRIGAÇÃO NO CERRADO - Área de concentração: Tecnologias de Irrigação.

CERES - GO  
FEVEREIRO, 2024

Ao meu esposo Daniel Pereira da Silva, meu companheiro de vida, que sempre está ao meu lado, enfrentando batalhas, segurando em minha mão em momentos bons e ruins, me mantendo firme em minhas metas e me lembrando que sou capaz todos os dias, com quem construirei minha família,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me conceder saúde, sabedoria e coragem para conquistar todos os meus objetivos, apesar das dificuldades enfrentadas.

Ao meu esposo Daniel Pereira da Silva, pelo apoio e companheirismo, por não medir esforços para me auxiliar durante toda a trajetória do mestrado, por acreditar em mim e não me deixar desistir, por ter trilhado comigo essa trajetória e por ter encarado juntos esse desafio, tornou a batalha mais fácil.

À minha mãe Fátima Rodrigues e ao meu pai Euripedes Souza, pelo incentivo, por sempre acreditar em mim, estar sempre de prontidão e me ajudar em tudo o que foi possível.

Ao meu sogro Francisco Pereira e minha sogra Doralice Luciano, por me considerar como filha, por me ajudar tanto e me incentivar na realização do mestrado.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, pela estrutura, suporte e educação de qualidade, ao qual serei eternamente grata por ter realizado a maior parte da minha trajetória acadêmica nessa instituição, são evidentes minha paixão e gratidão por essa instituição.

Ao corpo docente, à direção e à administração, pelo esforço, dedicação e contribuição na minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Dr. Wesley de Melo Rangel, para o qual me faltam palavras para agradecer, pois mesmo com sua rotina puxada, me incentivou, me ensinou muito, não me deixou desanimar quando algo não dava certo, esteve comigo durante todas as etapas de execução do projeto, com toda certeza, a conclusão do projeto só foi possível por suas orientações e ajuda, hoje compreendo o verdadeiro significado de orientação. Obrigada por tanto.

À minha coorientadora, Dra. Priscila Jane Romano Gonçalves Selari, que foi minha orientadora no início do projeto, meu muito obrigada pela orientação inicial.

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Raquel Rodrigues Máximo de Souza, nascida em 27 de junho de 1997, natural de Uruana – Goiás, filha de Fátima Rodrigues Máximo de Souza e Euripedes Rodrigues de Souza, esposa de Daniel Pereira da Silva. Em 2013, ingressou no curso Técnico em Informática integrado ao Ensino Médio, no Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, concluindo em 2015. Em 2016, na mesma instituição iniciou a graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, concluindo em 2019. Em 2021, ingressou na Pós-Graduação em Formação de Professores e Práticas Educativas, também no IF Goiano – Campus Ceres, finalizando em 2023. Ainda na mesma instituição, em 2022, ingressou no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Irrigação no Cerrado, desenvolvendo pesquisas relacionadas à inoculação de bactérias diazotróficas, a ser concluído no semestre 2023/2. Atualmente, reside na cidade de Nova Crixás – Goiás, onde leciona as disciplinas Ciências da Natureza no ensino fundamental II e Biologia na Educação de Jovens e Adultos na rede estadual de Goiás.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da divisão dos quadrantes na placa de Petri (100 x 15 mm). Cada quadrante tem 1,5 x 1,5 cm..... 15
- Figura 2. Altura de plantas (cm) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de *A. brasilense*. Dose 1 = 100 mL ha-1. Dose 2 = 200 mL ha-1. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 5 repetições)..... 21
- Figura 3. Diâmetro do colmo (mm) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 15 repetições)..... 21
- Figura 4. Número de folhas de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 15 repetições)..... 22
- Figura 5. Área foliar (cm<sup>2</sup>) de milho AG1051 com sementes inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense*. Dose 1 = 100 mL ha-1. Dose 2 = 200 mL ha-1. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 10 repetições)..... 23
- Figura 6. Número de células viáveis por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL de inoculante pela técnica de contagem da microgota, em meio *Rojó Congo* modificado. (n = 27 réplicas)..... 25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inoculantes comerciais à base de <i>Azospirillum brasilense</i> , com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, recomendadas para a cultura do milho. ....	8
Tabela 2. Ingredientes ativos de fungicidas registrados para o tratamento de sementes em milho.....	9
Tabela 3. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de milho AG1051 tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de <i>A. brasilense</i> . ....	16
Tabela 4. Comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), massa seca da raiz (MSR) e massa seca da folha (MSF) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de <i>A. brasilense</i> . ....	17
Tabela 5. Massa fresca da raiz (MFR), massa fresca do colmo (MFC) e massa fresca das folhas (MFF) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de <i>A. brasilense</i> . ....	23

## LISTA DE SIGLAS

<b>Símbolos/siglas</b>	<b>Significado</b>
%	Porcentagem
ADP	Adenosina difosfato
AF	Área foliar
ATP	Adenosina trifosfato
BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
Ca	Cálcio
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	Nitrato de cálcio
CR	Comprimento da Raiz
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sulfato de Cobre II ICO
D0	Sem inoculante
D1	Dose recomendada
D2	Dobro da dose recomendada
DC	Diâmetro do colmo
e <sup>-</sup>	Elétron
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Fator de diluição
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
Fe	Ferro
g	Gramas
h	Horas
H <sup>+</sup>	Cátion hidrogênio
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
K	Potássio
kg	Quilogramas
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potássio
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MFC	Massa Fresca do Colmo
MFF	Massa Fresca da Folha
MFR	Massa Fresca da Raiz



Mg	Magnésio
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Cloreto de manganês II
MSC	Massa Seca do Colmo
MSF	Massa Seca da Folha
MSR	Massa Seca da Raiz
N	Nitrogênio
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Molibdato de Sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NF	Número de Folhas
NH <sub>3</sub>	Amônia
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Amônio Monobásico
NR	Número de Raiz
°C	Graus Célsius
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
RC	Rojo congo
S	Enxofre
s	Segundos
UFC	Unidade formadora de colônias
VP	Volume plaqueado
VT	Volume total de inoculante no tubo amostrado.
Zn	Zinco
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinco
μL	Microlitro
%G	Porcentagem de germinação
IVG	Índice de velocidade de germinação
TMG	Tempo médio de germinação
VMG	Velocidade média de germinação

---

## RESUMO

SOUZA, RAQUEL RODRIGUES MÁXIMO DE. Instituto Federal Goiano – Campus Ceres/GO, fevereiro de 2024. **Compatibilidade da inoculação de *Azospirillum brasilense* com pesticidas utilizados no tratamento de sementes de milho.** Orientador: Dr. Wesley de Melo Rangel. Coorientadora: Priscila Jane Romano Gonçalves Selari.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas produzidas no Brasil. Para ele alcançar a máxima produtividade, diversos fatores têm sido cruciais, como o uso de pesticidas e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Porém a aplicação de pesticidas pode comprometer os benefícios da inoculação. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos do tratamento de sementes com fungicida e da inoculação com *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento de plântulas de milho AG 1051. Foram conduzidos dois testes de germinação de sementes sob aplicação de fungicida e inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, um ensaio em *in vitro* e outro em casa de vegetação. Ambos tiveram o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos, dispostos em esquema fatorial 3x2, sendo 3 níveis de inoculação i: sem inoculante, ii: dose recomendada (100 mL ha<sup>-1</sup>) e iii: dobro da dose recomendada (200 mL ha<sup>-1</sup>) e 2 níveis de fungicida (com e sem aplicação). Além disso, foi avaliada a qualidade de quatro inoculantes comerciais, produzidos no Brasil, contendo estirpes de *A. brasilense* recomendadas para a cultura do milho. O teste de germinação *in vitro* demonstrou que, na ausência do tratamento com fungicida, as sementes inoculadas com a dose 1, equivalente a 100 mL ha<sup>-1</sup>, apresentaram maior porcentagem de germinação, cerca de 22,5% superior ao tratamento com fungicida e dose 1. No entanto, este comportamento não foi observado sob a dose 2, equivalente a 200 mL ha<sup>-1</sup>. No teste de germinação em casa de vegetação, algumas variáveis também mostraram efeito negativo do fungicida sobre a inoculação das sementes de milho com *A. brasilense*, tendo as sementes inoculadas mostrado melhor resultado sob ambas as doses de inoculante, quando não foram tratadas com fungicida. Na verificação da concentração de células viáveis de *A. brasilense* em quatro inoculantes comerciais diferentes produzidos no Brasil, observou-se que, em dois produtos, o valor das unidades formadoras de colônia (UFC) se situava abaixo do recomendado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Considerando que o tratamento de sementes de milho com fungicida pode interferir nos benefícios da inoculação com *A. brasilense*, o controle de qualidade de inoculantes é imprescindível para garantir o mínimo da eficácia da inoculação, amenizando os efeitos da incompatibilidade com fungicidas utilizados no tratamento de sementes.

**Palavras-chave:** Interações milho-microrganismos, Inoculantes microbianos de sementes, Qualidade.

## ABSTRACT

SOUZA, RAQUEL RODRIGUES MÁXIMO DE. Goiano Federal Institute, Ceres Campus, Goiás State (GO), Brazil, February 2024. **Compatibility of *Azospirillum brasilense* inoculation with pesticides used in the corn seed treatment.** Advisor: Prof. Dr. Rangel, Wesley de Melo. Coorientadora: Priscila Jane Romano Gonçalves Selari.

Corn (*Zea mays* L.) is one of the main crops produced in Brazil and many factors have been crucial to achieve maximum yield, such as using pesticides and inoculation of bacteria that promote plant growth. However, the pesticide application can compromise the inoculation benefits. Therefore, this paper aimed to evaluate the seed treatment effects with fungicide and the inoculation with *Azospirillum brasilense* on the cv. AG 1051 corn seedling development. Two seed germination tests were carried out under fungicide application and inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6, an *in vitro* test and another in a greenhouse. Both had a completely randomized design (CRD) with six treatments arranged in a 3x2 factorial scheme, 3 inoculation levels: (a) without inoculant; (b) recommended dose (100 mL ha<sup>-1</sup>); and (c) double the recommended dose (200 mL ha<sup>-1</sup>) and 2 fungicide levels (with and without application). Furthermore, the quality of four commercial inoculants produced in Brazil containing strains of *A. brasilense* recommended for corn crop was evaluated. The *in vitro* germination test showed that seeds inoculated with dose 1 equivalent to 100 mL ha<sup>-1</sup> in the absence of treatment with fungicide showed a higher germination percentage, approximately 22.5% higher than the fungicide treatment and dose 1. However, this behavior was not observed under dose 2 equivalent to 200 mL ha<sup>-1</sup>. Some variations also showed the fungicide negative effect on the corn seed inoculated with *A. brasilense* in the greenhouse germination test, in which the inoculated seeds showed better results under both inoculant doses when they were not treated with fungicide. When verifying the viable cells concentration of *A. brasilense* in four different commercial inoculants produced in Brazil, it was noted that the value of colony forming units (CFU) was below that recommended by the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA, Brazilian acronym) of this country in two products. Since the corn seed treatment with fungicide can affect the inoculation benefit with *A. brasilense*, the inoculant quality control is essential to guarantee the minimum inoculation effectiveness, mitigating the incompatibility effects with fungicides used in seed treatment.

**Keywords:** Maize-microbe interactions, Quality, Seed microbial inoculants.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Produção de alimentos e a cultura do milho.....	3
2.2 Fixação biológica do nitrogênio .....	4
2.3 Bactérias Diazotróficas (Promotoras de crescimento vegetal).....	5
2.4 O gênero <i>Azospirillum</i> e a espécie <i>Azospirillum brasilense</i> .....	7
2.5 Bioinsumos - Inoculante à base de <i>Azospirillum brasilense</i> recomendado para o milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6.....	8
2.6 O uso de pesticidas (fungicidas e inseticidas) no tratamento de sementes de milho.....	9
2.7 Importância de um programa de controle de qualidade.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Cultura, microrganismos e fungicidas .....	10
3.2 Germinação de sementes de milho AG 1051 sob aplicação de fungicida e inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6: Ensaio <i>in vitro</i> .....	11
3.3 Germinação de sementes de milho AG 1051 sob aplicação de fungicida e inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6: Experimento em casa de vegetação .....	12
3.4 Controle de qualidade de inoculantes de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
4.1 Germinação de sementes de milho AG 1051 tratadas com fungicida e inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6: Experimento <i>in vitro</i> .....	16
4.2 Germinação de sementes de milho AG 1051 tratadas com fungicida e inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6: Experimento em casa de vegetação .	17
4.3 Controle de qualidade de inoculantes de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	24
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é uma gramínea pertencente à família Poaceae, originária da América Central. É uma das principais culturas produzidas no Brasil, visto que, anualmente, são cultivados cerca de oito milhões de hectares, divididos em várias microrregiões nacionais (Lemos; Rodriguez; Alves, 2020). O milho é o segundo grão mais produzido no Brasil, sendo o terceiro maior produtor mundial da cultura, atrás apenas de Estados Unidos e China (CONAB, 2023). Os grãos produzidos são destinados à alimentação animal e humana e à indústria para produção de etanol (CONAB, 2023). No estado de Goiás, a cultivar AG 1051 é bastante utilizada para o consumo de milho-verde e para o preparo de vários derivados do milho.

No Brasil, com o objetivo de alcançar a máxima produtividade do milho, além do manejo do solo, do uso de fertilizantes e do melhoramento genético, vêm sendo também empregados no tratamento de sementes a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e o uso de fungicidas e inseticidas. Entre as BPCV, a espécie *Azospirillum brasilense* tem sido a mais estudada, sendo recomendada para inoculação em Poaceae, em razão dos múltiplos mecanismos desempenhados, os quais beneficiam o desenvolvimento de plantas, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Galindo et al., 2019), a produção de fito-hormônios como auxinas (Zhang et al., 2018), citocininas, giberelinas e etileno (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018), além de conseguir aumentar a disponibilidade de nutrientes e auxiliar na resistência a patógenos (López-Reyes et al., 2017).

Alguns estudos relatam contribuições eficientes da inoculação com *A. brasilense* em Poaceae, apresentando aumentos de 18% a 30% no potencial produtivo para cultura de trigo e milho, respectivamente, e reduzindo em cerca de 50% a necessidade de adubação nitrogenada de cobertura, sem afetar a produtividade (Hungria et al., 2010; Vogel et al., 2015). No entanto, há poucas informações a respeito dos efeitos decorrentes da compatibilidade do tratamento químico das sementes com pesticidas e da inoculação com *A. brasilense* no desenvolvimento das plantas de milho AG 1051.

A incompatibilidade entre fungicidas utilizados no tratamento de sementes e inoculantes biológicos é considerada um dos grandes problemas na cultura da soja. Alguns estudos comprovaram a incompatibilidade de agrotóxicos com a simbiose *Bradyrhizobium japonicum*-soja, causando menor nodulação e, conseqüentemente,

diminuindo as taxas de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Osman et al., 2012; Rodrigues et al., 2020; Vogel et al., 2015).

Depois da soja, o milho é a segunda cultura em que mais são aplicados agrotóxicos (Pignati et al., 2017). Essa aplicação de fungicidas no tratamento de sementes pode comprometer os benefícios da inoculação (Santos; Nogueira; Hungria, 2019), contudo o uso exagerado de pesticidas na cultura do milho pode causar danos à biologia dos microrganismos utilizados para o preparo dos inoculantes, afetando a eficiência do uso de inoculantes com estirpes de bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, que são recomendadas para a cultura no Brasil, além de causar danos à biologia do solo, que pode resultar na diminuição da qualidade e da quantidade da colheita (Rani et al., 2021).

Alguns estudos comprovam que determinados ingredientes ativos, em especial fungicidas, vêm mostrando efeitos danosos sobre a atividade de BPCV, como vem ocorrendo com *Bradyrhizobium* spp. (Rodrigues et al., 2020) e *Azospirillum* spp. (Pereira et al., 2019; Santos et al., 2020).

Portanto, como o tratamento de sementes com produtos químicos é um manejo bastante difundido na cultura do milho no Brasil (Fukami et al., 2016), torna-se fundamental avaliar a compatibilidade entre produtos químicos empregados no tratamento de sementes e inoculantes agrícolas e sua especificidade em relação a cada cultivar. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do tratamento de sementes com o fungicida MAXIM® XL e da inoculação com *A. brasilense* no desenvolvimento de plântulas de milho AG 1051.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Produção de alimentos e a cultura do milho**

A população mundial tem aumentado significativamente nos últimos anos. Segundo as estimativas, ela deve crescer para mais de 9 bilhões de pessoas até o ano de 2050 (ONU, 2021). Com o aumento populacional, a demanda por alimentos também cresce, assim como a urbanização e a industrialização (Mahanty et al., 2017). Diante do exposto, deve-se ampliar também a produção agrícola para garantir a produção de grãos e a segurança alimentar, além de buscar estratégias de produção que resultem num mínimo impacto ambiental.

Os cereais são grãos essenciais para a alimentação humana, sendo uma fonte fundamental de obtenção de energia (FAO, 2020). O milho (*Zea mays*) é um cereal relevante na dieta humana e uma das principais fontes de nutrientes nos países em desenvolvimento em razão da sua alta produção e do seu baixo custo. Esse cereal é pertencente à família Poaceae, sendo uma planta de fácil cultivo, considerada “domesticada” por ter capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, com cultivos de norte ao sul, em altas e baixas altitudes (Paliwal et al., 2000).

Apesar de ser originário de região tropical, o milho (*Zea mays*) adapta-se e se desenvolve em ambientes variáveis ao redor do mundo. Cerca de 75% da produção mundial de milho é alcançada em oito países (FAO, 2019). No Brasil, o milho está no grupo dos cereais mais cultivados e comercializados, pelo alto valor nutricional de seus grãos e pela ampla utilização na alimentação humana e animal. Cerca de 80% dos grãos produzidos no Brasil são direcionados à criação de suínos e aves (FAO, 2020; Garcia et al., 2006).

O milho é classificado no grupo das plantas C4, é uma espécie monoica, robusta, de ciclo anual, apresenta raiz fasciculada e um caule ereto, pode atingir até 3 metros, apresentar 12 a 20 folhas, conforme o fornecimento de água, as funções do híbrido e as condições edafoclimáticas (Eisinger; Paranhos, 2017; Ribeiro et al., 2020). Em condições normais, as sementes absorvem água, e a emergência ocorre entre 4 e 7 dias após a semeadura, logo, seguem os estádios vegetativos até o pendoamento, sendo, na sequência, iniciados os estádios reprodutivos, com a polinização e a fertilização (Abendroth et al., 2011).

A taxa de desenvolvimento da cultura do milho varia de acordo com diversos fatores, como temperatura, disponibilidade de água, radiação solar, fotoperíodo e fertilidade do solo (Coelho, 2006). A planta de milho necessita de elevada quantidade de macro e micronutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn), enxofre (S), entre outros, que estão disponíveis no solo (Gondim et al., 2016). Porém, a maioria dos solos brasileiros necessita do uso de fertilizantes químicos para suprir a demanda da cultura.

## 2.2 Fixação biológica do nitrogênio

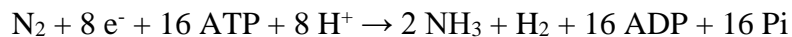
A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo natural realizado por um grupo de procariotos que têm a habilidade de converter o  $N_2$  atmosférico em amônia, uma das formas assimiláveis pelas plantas. Este processo é reconhecido como o segundo mais crucial na natureza, ficando atrás apenas da fotossíntese (Freitas; Fernandes-Júnior, 2021). Salienta-se que os microrganismos capazes de fixar o nitrogênio estão distribuídos em diversos grupos filogenéticos de Bactérias e Arqueas, e essa ampla diversidade assegura sua presença em habitats variados (Merloti et al., 2019).

Estima-se que a FBN contribua com aproximadamente 65% de todo o N reativo introduzido no ciclo do nitrogênio no planeta. Quando a associação entre os microrganismos fixadores de  $N_2$  e as plantas é eficiente, o  $N_2$  fixado pode atender plenamente às necessidades de várias espécies de importância econômica e ambiental, eliminando a necessidade de utilizar fertilizantes nitrogenados minerais (Souza; Castro, 2022). No caso da simbiose com leguminosas, relata-se aporte de centenas de quilogramas de N por hectare a cada ciclo (Ormeño-Orrillo; Hungria; Martinez-Romero, 2013). No entanto, cabe ressaltar que a inoculação de *Azospirillum brasilense* no milho não supre totalmente a demanda de N, faz apenas uma substituição parcial, considerando o tipo de interação planta-microrganismo estabelecida por ambos os organismos, diferindo completamente da interação estabelecida entre *Bradyrhizobium* spp. e soja.

Em linhas gerais, a fixação biológica de nitrogênio ocorre pela presença da enzima nitrogenase nos microrganismos fixadores de nitrogênio. Essa enzima é reconhecida como um complexo enzimático responsável por romper a ligação tripla do  $N_2$  ( $N\equiv N$ ), utilizando energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (Branco;



Prates Júnior, 2022). Esse processo resulta na redução do nitrogênio atmosférico a amônia (NH<sub>3</sub>), que pode ser assimilada pelas plantas (Meyer et al., 2022). A reação do processo de fixação realizado pelos microrganismos pode ser descrita da seguinte maneira:



Pesquisas vêm sendo conduzidas em gramíneas com o objetivo de avaliar os efeitos positivos da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Em geral, são utilizadas cepas de bactérias diazotróficas endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia tropica* para o processo de inoculação. Vale destacar que essas bactérias também desempenham papel como promotoras do crescimento, produzindo fito-hormônios que favorecem o desenvolvimento vegetal (Lucangeli; Bottini, 1997). Entretanto, é imprescindível conduzir mais pesquisas para compreender como esses microrganismos podem desempenhar seu papel nesse tipo específico de plantas. O processo de FBN é realizado por bactérias que vivem naturalmente em vários ambientes, incluindo o solo. As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como associativas, colonizando o interior das plantas, além da superfície das raízes, caules, colmos e folhas, onde realizam a FBN. Diferentemente do sistema simbiótico, as bactérias do sistema associativo não induzem a formação de nódulos nas plantas. Embora sejam capazes de realizar a FBN, a contribuição das bactérias associativas para a nutrição vegetal (fornecimento direto de N) não é tão expressiva como observado no sistema simbiótico. No sistema simbiótico, as bactérias estão no interior dos nódulos, em íntima relação com a planta hospedeira, o que minimiza perdas por interferência de vários fatores químicos, físicos e biológicos (Moreira et al., 2013; Veronezi, Ribeiro, Ceccon, 2018).

### **2.3 Bactérias Diazotróficas (Promotoras de crescimento vegetal)**

As bactérias diazotróficas são microrganismos que têm capacidade de fazer a fixação biológica de nitrogênio (FBN), convertendo o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em formas assimiláveis pelas plantas, como a amônia (NH<sub>3</sub>), ou em compostos nitrogenados relacionados (Hungria et al., 2022). Essa habilidade é possível pela presença da enzima nitrogenase, responsável por quebrar a ligação tripla do N<sub>2</sub>,

tornando-o disponível para a síntese de moléculas nitrogenadas (Branco; Prates Júnior, 2022).

Além de desempenharem um papel no processo de fixação biológica de nitrogênio, essas bactérias também têm capacidade de produzir reguladores de crescimento, exercendo influência no desenvolvimento das plantas (Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014; Spaepen; Vanderleyden; Remans, 2007). Esse efeito se traduz em um aprimoramento do sistema radicular, resultando em maior eficiência na absorção de água e nutrientes. Os principais compostos promotores do crescimento produzidos por bactérias diazotróficas são os fito-hormônios, como as auxinas, as giberelinas e as citocininas (Dartora et al., 2013).

A utilização de bactérias diazotróficas em gramíneas tem se tornado uma prática frequente na agricultura. Nesse contexto, diversas espécies bacterianas com potencial para fixação de nitrogênio e associação com gramíneas foram identificadas, incluindo *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Soares et al., 2023). Essas bactérias têm a capacidade de colonizar tanto a rizosfera quanto a planta como um todo, estabelecendo-se em ambientes protegidos contra o excesso de oxigênio e outros fatores adversos. Essa condição favorece a expressão plena de seu potencial para a fixação biológica do nitrogênio (Chaves et al., 2015).

Chaves et al. (2015), ao estudarem o efeito do desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas, concluíram que a inoculação individual de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Azospirillum amazonense* (BR11145) e *Burkholderia tropica* (BR11366) aumenta o índice de velocidade de brotação nas duas variedades testadas. Bartchechen et al. (2010) analisaram o impacto da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura de milho. Em linhas gerais, os autores concluíram que a inoculação com esses microrganismos não resultou em aumento na produtividade de grãos de milho em comparação com a adubação nitrogenada de cobertura.

Diante disso, é necessário conduzir mais estudos envolvendo a inoculação de bactérias diazotróficas, especialmente em gramíneas, uma vez que fatores como genótipo, condições edafoclimáticas e estirpe da bactéria utilizada podem ter contribuído para esse resultado.

## 2.4 O gênero *Azospirillum* e a espécie *Azospirillum brasilense*

O gênero *Azospirillum* abriga bactérias gram-negativas que exibem comportamento aeróbico ou microaerofílico, sendo situadas na classe das Alfaproteobacterias, pertencentes à família Rhodospirillaceae (Quadros et al., 2014). Tais bactérias estão presentes em quase todos os ecossistemas terrestres, sendo sua disponibilidade e atividade dependentes de fatores como pH, umidade, temperatura e disponibilidade de fontes de carbonos (Chotte et al., 2002). Até a presente data, há 25 espécies descritas deste gênero, tendo sido as espécies *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* as primeiras a serem descritas (Tarrand; Krieg; Dobereiner, 1978; DSMZ, 2024).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são bem conhecidas pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em associação com as raízes de diversas plantas (Marini et al., 2015). Uma espécie notável dentro desse gênero é a *Azospirillum brasilense*. Esta bactéria diazotrófica é reconhecida por sua aplicação na agricultura como promotora de crescimento vegetal, contribuindo para o desenvolvimento e a saúde das plantas.

A espécie *Azospirillum brasilense* tem sido objeto de estudo em razão das suas propriedades benéficas para diversas culturas, principalmente cereais e gramíneas. Essas bactérias são capazes de fixar nitrogênio e produzir fito-hormônios que estimulam o crescimento das raízes em diversas espécies de plantas, resultando em uma absorção aprimorada de água e minerais e maior tolerância a estresses como salinidade e seca (Silva et al., 2021). Esse processo contribui para o desenvolvimento de plantas mais vigorosas e produtivas.

Pereira et al. (2015), ao investigarem a inoculação de *A. brasilense*, constataram que essa prática, quer seja realizada via semente ou sulco de semeadura, não exerce influência sobre o índice de clorofila das plantas de milho. Entretanto, os mesmos autores notaram aumento no teor de nitrogênio em dois genótipos de milho (2B707 e o híbrido sintético V2) quando a inoculação foi feita via sulco. Em contraste, Ciciliato e Casimiro (2015) não identificaram efeitos positivos da inoculação da mesma bactéria na produtividade de grãos de milho.

Em um estudo com 54 variedades de cana-de-açúcar, Lopes et al. (2019) observaram diferença significativa na resposta dessas variedades ao tratamento com dois inoculantes compostos por *A. brasilense*. Esses autores notaram aumento nos valores de características relacionadas à promoção do crescimento das plantas e sugeriram que estudos adicionais devem ser realizados. Lopes et al. (2019) também

identificaram resultados positivos em cana-de-açúcar inoculada com *A. brasilense*, evidenciando respostas favoráveis no número de colmos, altura e grau Brix.

Portanto, nota-se que a espécie *A. brasilense* pode promover incremento de produtividade quando inoculada em gramíneas, sendo necessária a condução de novas pesquisas.

## 2.5 Bioinsumos - Inoculante à base de *Azospirillum brasilense* recomendado para o milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6

A inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, tem promovido diversos benefícios na cultura do milho, tanto isoladamente quanto em conjunto, resultando na promoção do crescimento e no aumento do rendimento de grãos. De acordo com Meyer et al. (2022), a inoculação com Ab-V5 e Ab-V6 resultou em incremento médio no rendimento de grãos de 3,1%. Além disso, os autores verificaram que os incrementos foram confirmados em condições variadas de clima, textura de solos e com diferentes teores de matéria orgânica.

Spolaor et al. (2016) estudaram o efeito de bactérias promotoras de crescimento associadas à adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. De forma geral, os autores evidenciaram que, na ausência da adubação de cobertura, os tratamentos à base das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foram superiores ao não inoculado, com incrementos significativos da produtividade.

Atualmente, há diversas opções de produtos comerciais disponíveis no mercado que são formulados com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, sendo esses produtos recomendados para a produção de milho. Diante disso, os principais produtos comerciais com *Azospirillum brasilense*, com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Inoculantes comerciais à base de *Azospirillum brasilense*, com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, recomendadas para a cultura do milho

Produto Comercial	Fabricante
Azzofix®	Tradecorp
AzoTotal®	Tradecorp
Basfoliar® NitroMax Milho	Compo Expert
Biomax® Azum	Vittia
NoduGram® L	Nodusoja

**Fonte:** Autores (2024).

## 2.6 O uso de pesticidas (fungicidas e inseticidas) no tratamento de sementes de milho

O tratamento de sementes envolve a aplicação de caldas formuladas com defensivos agrícolas, visando a proporcionar à semente a proteção necessária contra patógenos e pragas. Esse processo favorece a germinação e o crescimento das plantas, permitindo que expressem todo o seu potencial de produtividade (Chiaradia; Wordell Filho, 2012). Os defensivos agrícolas utilizados no tratamento de sementes podem ter ação de contato ou sistêmica, sendo os primeiros de amplo espectro, enquanto os segundos são mais específicos e contam com um menor número de ingredientes ativos disponíveis.

Para o controle de pragas no milho, sobretudo das pragas de solo, são utilizados os inseticidas, sendo que os principais grupos químicos e respectivos ingredientes ativos incluem os neonicotinoides (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam), os piretroides (bifentrina, ciflutrina, cialotrina, cipermetrina e deltametrina), os carbamatos (aldicarbe, benfuracarbe, metiocarbe e tiodicarbe), pirazol (fipronil) e avermectina (abamectina) (Chiesa et al., 2016).

Já para o controle de patógenos, como os fungos, são empregados os fungicidas, sendo os principais ingredientes ativos registrados para o milho descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Ingredientes ativos de fungicidas registrados para o tratamento de sementes de milho

Ingredientes ativos
Captan
Carboxina + Tiram
Carbendazim + Tiram
Fluazinam + Tiofanato metílico
Fludioxonil
Fludioxonil + Metalaxil – m
Fludioxonil + Metalaxil -m + Tiabendazol
Piraclostrobina + Tiofanato – Metílico
Tiram

**Fonte:** Meyer et al. (2019).

## **2.7 Importância de um programa de controle de qualidade**

Por definição, inoculante é um produto que contém microrganismos benéficos para o desenvolvimento das plantas, desempenhando a função de veículo para o transporte de bactérias selecionadas. Vale ressaltar a existência de duas formas físicas de inoculantes: os sólidos, apresentados em pó com turfa como veículo para as bactérias, e os fluidos líquidos, que estabilizam as bactérias em seus processos metabólicos por meio de protetores celulares (Carvalho; Ferreira; Hungria, 2010).

A adoção de inoculantes microbianos está gerando uma crescente necessidade de atualizações na legislação, treinamento contínuo para um corpo de fiscalização ativo devidamente instruído, além do estabelecimento de laboratórios de referência para a análise desses produtos. Tais medidas são cruciais para evitar a redução da eficiência da fixação biológica de nitrogênio e a produção de fito-hormônios, em decorrência da baixa qualidade dos inoculantes e da implementação de sistemas de inoculação inadequados, os quais poderiam resultar na diminuição do número de células viáveis nas sementes (Carvalho; Hungria; Miura, 2009).

Além disso, a composição de cada inoculante deve incluir exclusivamente as cepas recomendadas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Conforme as normas brasileiras atuais, é exigida uma concentração mínima de  $1 \times 10^8$  células viáveis por grama ou mL do produto, com ausência de contaminantes a partir da diluição de  $10^{-5}$  (Brasil, 2011; Carvalho; Ferreira; Hungria, 2010). Tais diretrizes asseguram a qualidade e a eficácia dos inoculantes, contribuindo para o êxito da inoculação em processos agrícolas.

Salienta-se que, para o controle de qualidade de inoculantes, é recomendado seguir a Instrução Normativa MAPA/SDA nº 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil, 2010), que regulamenta o controle de qualidade do produto comercial (inoculantes), abordando as metodologias a serem observadas pelos laboratórios certificados pelo MAPA.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Cultura, microrganismos e fungicidas**

A cultura selecionada para realização do experimento foi o milho (*Zea mays* L.), optando-se pelo híbrido AG 1051. As sementes do híbrido foram adquiridas

comercialmente, o qual é muito utilizado na produção de milho-verde, sendo destinado à silagem e também à produção de pamonha. O híbrido tem flexibilidade de plantio em todas as regiões do Brasil e alto poder de produção de matéria seca e de proteína para silagem (Andrade, 2018).

Os experimentos foram conduzidos com as cepas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (=CNPSo 2083) e Ab-V6 (=CNPSo 2084), utilizando inoculante líquido comercial, com concentração de  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) mL<sup>-1</sup>. A dose recomendada pelo fabricante para a cultura do milho é de 100 mL ha<sup>-1</sup>.

Foi utilizado o fungicida sistêmico e de contato MAXIM<sup>®</sup> XL (Syngenta), o qual é empregado no tratamento de sementes de milho para evitar o ataque de *Fusarium moniliforme* (podridão-do-colmo, podridão-rosada-do-milho) e *Pythium aphanidermatum* (podridão-do-colmo). Este fungicida é composto por metalaxil-M 10 g L<sup>-1</sup> (1% m/v) e fludioxonil 25 g L<sup>-1</sup> (2,5% m/v). Metalaxil-M penetra no tegumento da semente, sendo sistematicamente translocado para todas as partes da planta durante a germinação, enquanto o fludioxonil é um fungicida de contato de amplo espectro com atividade residual, apresentando limitada absorção pela semente e pequena translocação dentro da plântula. A dose recomendada pelo fabricante é de 1,5 mL por kg de sementes de milho.

### **3.2 Germinação de sementes de milho AG 1051 sob aplicação de fungicida e inoculação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6: Ensaio *in vitro***

As sementes do milho AG 1051 foram desinfestadas superficialmente, sendo imersas em etanol 70% por 5 min, na sequência, por imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos. Após isso, as sementes foram lavadas em água destilada estéril por cinco vezes (Santos et al., 2021). Após a desinfestação superficial, as sementes foram tratadas com o fungicida. Em seguida, foram secas à temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, as sementes tratadas e não tratadas com fungicida foram inoculadas com as cepas de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, na dose recomendada e com dobro da dose recomendada.

O experimento foi delineado inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e cinco repetições, dispostos em esquema fatorial 3x2, sendo 3 níveis de

inoculação, i: sem inoculante, ii: dose recomendada e iii: dobro da dose recomendada e 2 níveis de fungicida (com e sem aplicação).

As sementes foram germinadas, sob condições axênicas, em placas de Petri (150 x 25 mm) contendo meio ágar-água (0,5%). Foram dispostas 12 sementes por placa, as quais foram incubadas em BOD a 30° C, com fotoperíodo de 12h/12h, por 5 dias.

Para avaliar a germinação, o número de sementes germinadas foi registrado diariamente para verificar a porcentagem de germinação.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade da variância, seguido da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2019).

### **3.3 Germinação de sementes de milho AG 1051 sob aplicação de fungicida e inoculação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6: Experimento em casa de vegetação**

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação para avaliar a compatibilidade do tratamento de sementes de milho com o fungicida Maxim XL e a inoculação com o inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, na dose recomendada, com dobro da dose recomendada.

O milho foi cultivado em garrafas long neck de vidro (330 mL), estéreis e recicláveis, utilizando solução nutritiva de Hoagland-Arnon, estéril (Hoagland; Arnon, 1950), a 1/4 de força.

A solução foi preparada adicionando, em 4L de água destilada, os seguintes volumes (mL) das soluções estoque: 1,0 de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (115,03 g  $\text{L}^{-1}$ ); 6,0 de  $\text{KNO}_3$  (101,11 g  $\text{L}^{-1}$ ); 4,0 de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (236,16 g  $\text{L}^{-1}$ ); 2,0 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (246,9 g  $\text{L}^{-1}$ ); 1,0 de micronutrientes ( $\text{H}_2\text{BO}_3$  2,86 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,81 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,22 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,092 mg  $\text{L}^{-1}$ ); e 1,0 de Fe-EDTA.

Dentro de cada garrafa, foram colocadas duas folhas de papel-filtro, que serviram de suporte e condução da solução para as radículas recém-emergidas (Florentino et al., 2009). As garrafas foram envoltas com papel alumínio para evitar o superaquecimento da solução pela radiação solar no interior da casa de vegetação e esterilizadas em autoclave a 121 °C por 30 min.



O experimento foi conduzido em DIC com seis tratamentos e cinco repetições, dispostos em esquema fatorial 3x2, sendo 3 níveis de inoculação, i: sem inoculante, ii: dose recomendada e iii: dobro da dose recomendada e 2 níveis de fungicida (com e sem aplicação).

As sementes do milho AG 1051 foram desinfestadas superficialmente, sendo imersas em etanol 70% por 5 min, na sequência, por imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos. Após isso, as sementes foram lavadas em água destilada estéril por cinco vezes (Santos et al., 2021). Após a desinfestação superficial, as sementes foram tratadas com o fungicida. Em seguida, foram secas à temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, as sementes tratadas e não tratadas com fungicida foram inoculadas com as cepas de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, conforme a disposição dos tratamentos.

Após o tratamento com fungicida e a inoculação das sementes, semeou-se uma semente por garrafa, dentro da câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. Posteriormente, as garrafas foram dispostas em casa de vegetação.

As análises morfométricas nas plantas ocorreram aos 35 dias após a semeadura, tendo sido analisados o número de folhas (NF) das plantas, o diâmetro do colmo (DC) na altura do colo da planta e a altura da planta (AP), utilizando paquímetro e fita métrica, respectivamente.

As plantas foram separadas em folhas, colmo e raízes. As raízes foram lavadas com água corrente até a completa limpeza. Foram registrados a massa fresca da raiz (MFR), do colmo (MFC) e das folhas (MFF), o comprimento da raiz (CR) e o número de raízes (NR). Também foi mensurada a área foliar (AF) total das plantas, de acordo com a metodologia de Garcia et al. (2008). Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 60°C até peso seco constante. As raízes foram secas em estufa nas mesmas condições da parte aérea.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade da variância. As médias foram comparadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas no software SISVAR (Ferreira, 2019).

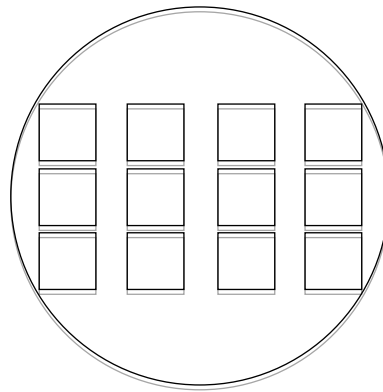
### **3.4 Controle de qualidade de inoculantes de *Azospirillum brasilense***

Três marcas de inoculantes comerciais, produzidas no Brasil, contendo as estirpes de *A. brasilense* AbV5 e AbV6, foram avaliadas. Duas embalagens pertenciam à uma mesma marca, totalizando quatro unidades amostrais. As especificações dos inoculantes nas embalagens estavam de acordo com as recomendações do MAPA (Brasil, 2011). As embalagens de todos os produtos avaliados estavam lacradas e dentro do período de validade. Os inoculantes foram armazenados sob condições de luminosidade e temperatura de acordo com as especificações dos fabricantes.

A contagem de células foi feita utilizando o meio *Rojo Congo* (RC), desenvolvido por E. Rodrigues Cáceres em 1982, para o isolamento de *Azospirillum* spp.. Procedeu-se à seguinte modificação do meio: o cloreto férrico descrito no meio RC original foi substituído pelo EDTA-Fe na mesma concentração (Ferreira; Nogueira; Hungria, 2016). Foi utilizada a técnica de contagem da microgota (Miles; Misra; Irwin, 1938; Di Salvo et al., 2022).

Para reduzir o erro associado ao manuseio, pipetagem e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), os equipamentos e materiais utilizados no estudo tinham as mesmas características e especificações. A amostragem e a contagem dos inoculantes foram feitas ao mesmo tempo, usando vidrarias e consumíveis com o mesmo padrão. A precisão e a acurácia para a pipetagem dos volumes de inoculante foram mantidas, utilizando micropipetas calibradas e ponteiras descartáveis pela mesma analista.

Previamente à realização das amostragens dos inoculantes, as embalagens lacradas foram desinfestadas externamente com etanol 70%. Após a desinfestação externa, os inoculantes nas embalagens lacradas foram homogeneizados manualmente para a retirada de amostras de 20 mL de cada inoculante, em triplicata. Para isto, foram utilizadas seringas estéreis para transferir o inoculante para tubos Falcon de 50 mL estéreis, tendo sido coletado um volume total de 60 mL de cada inoculante para avaliação. Os inoculantes nos tubos Falcon foram homogeneizados em vórtex por 30 s. Após isso, alíquotas de 100 µL foram pipetadas e transferidas para microtubos contendo 900 µL de solução tampão fosfato-salino (tampão PBS, sigla em inglês), formando a diluição  $10^{-1}$ . Após isto, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um microtubo contendo 900 µL de tampão PBS, formando a diluição  $10^{-2}$ . Este procedimento foi realizado até obter uma diluição  $10^{-8}$ . Os microtubos foram agitados em vórtex por 30 s a cada etapa de transferência da alíquota de 100 µL.



**Figura 1.** Representação esquemática da divisão dos quadrantes na placa de Petri (100 x 15 mm). Cada quadrante mede 1,5 x 1,5 cm

Após o preparo da diluição seriada, alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram inoculadas na superfície do meio RC modificado e incubadas em BOD a 30 °C após a secagem da microgota através da absorção pelo meio de cultura. Cada placa de Petri, cuja dimensão era 100 x 15 mm, foi dividida em 12 quadrantes com dimensão de 1,5 x 1,5 cm, para facilitar a pipetagem (Figura 1). Cada triplicata de quadrantes na vertical foi reservada por diluição seriada. As placas foram preparadas em triplicata. Antes da pipetagem de cada alíquota, as diluições seriadas foram homogeneizadas em vórtex por 30 s.

A contagem de UFC de *Azospirillum* e a observação de microrganismos contaminantes foram feitas diariamente. As avaliações foram feitas por sete dias após o aparecimento das primeiras colônias. Para a contagem, foram consideradas as diluições com média, de triplicata, entre 3 e 30 colônias. O número de bactérias foi calculado utilizando a seguinte fórmula (Herigstad et al., 2001):

$$\text{Número de células viáveis mL}^{-1} \text{ de inoculante} = (n/VP) \cdot (F \cdot VT),$$

em que **n** = média do número de colônias da triplicata da diluição avaliada; **VP** = volume plaqueado; **F** = fator de diluição; e **VT** = volume total de inoculante no tubo amostrado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Germinação de sementes de milho AG 1051 tratadas com fungicida e inoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6: Experimento *in vitro*

O teste de germinação *in vitro* de sementes de milho AG1051 demonstra que, na ausência do fungicida, as sementes inoculadas com a dose recomendada (dose 1), apresentaram maior porcentagem de germinação, cerca de 22,5% superior ao tratamento com fungicida + dose 1. No entanto, este comportamento não foi observado sob a dose com o dobro da dose recomendada (Tabela 3).

**Tabela 3.** Germinação *in vitro* de sementes de milho AG1051 tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de *A. brasilense*

	Fungicida	Inoculação		
		Não Inoculado	Dose 1 (100 mL ha <sup>-1</sup> )	Dose 2 (200 mL ha <sup>-1</sup> )
Germinação (%)	COM	85,40 aA	66,68 bB	86,10 aA
	SEM	77,08 aA	81,68 aA	77,78 aA

Os dados são apresentados pelo desdobramento da interação significativa entre Inoculante e Fungicida da ANOVA a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas, comparando os tratamentos de inoculação, e médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas, comparando a utilização de fungicida, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). (n = 5 repetições).

*Fusarium moniliforme* e *Cephalosporium* sp. são os principais fungos que infestam ou infectam sementes de milho nos campos de produção de sementes no Brasil, enquanto os fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são mais encontrados em condições de armazenamento. Estes fungos afetam a qualidade fisiológica das sementes de milho (Pinto, 1993), além disso, *Fusarium moniliforme* é capaz de inibir o desenvolvimento da raiz de plântulas de milho (Futrel; Kilgore, 1969). Embora o tratamento fitossanitário de sementes com fungicidas ou inseticidas possa auxiliar na preservação das sementes ao ataque de fungos e insetos, tem sido observado que o tratamento de sementes com pesticidas pode causar prejuízo na qualidade das sementes, afetando diretamente o vigor e a germinação (Pinto, 1993; Pereira et al., 2019).

Em condições normais de plantio, ou seja, condições de solo quente e úmido, observa-se baixo prejuízo para a germinação e o vigor, uma vez que a semente é raramente atacada por fungos. Os fungos do solo atacam as sementes de milho, principalmente em condições de solo frio e úmido, sendo observada redução da velocidade de emergência, aumentando a exposição das sementes aos patógenos. Por isso, o tratamento de sementes com fungicidas é recomendado para condições de solo

frio e úmido, além de áreas com elevado teor de matéria orgânica, onde se observa o desenvolvimento de populações de fungos dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Diplodia* etc. e ainda em áreas de pivô central com manejo inadequado de água e de culturas (EMBRAPA, 1993).

O uso de substâncias químicas no combate a patógenos de sementes interfere no processo germinativo (Roman; Pinto, 2003; Rosenthal et al., 2006). O revestimento de sementes com produtos químicos, especialmente inseticidas e fungicidas, restringe a embebição de água e o início do processo fisiológico ligado à germinação, reduzindo parâmetros da germinação e vigor, segundo Boni et al. (2016). Baldiga Tonin et al. (2014) também observaram que o tratamento químico em sementes de milho reduz o vigor das plântulas emergidas em campo. Porém, em outro estudo desenvolvido em campo para avaliar diferentes tratamentos químicos em sementes tratadas industrialmente, foi verificado que, independentemente do tratamento, não houve redução na produtividade de milho (Silva et al., 2019).

#### 4.2 Germinação de sementes de milho AG 1051 tratadas com fungicida e inoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6: Experimento em casa de vegetação

A análise de variância dos dados mostrou interação significativa entre os fatores ‘fungicida x inoculação’, para as variáveis comprimento de raiz (CR), número de raízes (NR), massa seca da raiz (MSR) e massa seca das folhas (MSF) (Tabela 4).

Tabela 4. Comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), massa seca da raiz (MSR) e massa seca das folhas (MSF) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de *A. brasilense*

Variáveis	Fungicida	Inoculação		
		Não inoculado	Dose 1 (100 mL ha <sup>-1</sup> )	Dose 2 (200 mL ha <sup>-1</sup> )
CR (cm)	COM	32,960 bA	45,584 aA	36,268 bB
	SEM	32,968 bA	45,500 aA	42,676 aA
NR	COM	6,500 bA	7,916 aB	9,000 aA
	SEM	4,938 bA	11,000 aA	10,400 aB
MSR (g)	COM	0,300 bB	0,520 aA	0,494 aA
	SEM	0,418 bA	0,526 aA	0,516 aA
MSF (g)	COM	0,287 bB	0,603 aA	0,543 aA
	SEM	0,437 bA	0,516 bA	0,615 aA

Os dados são apresentados pelo desdobramento da interação significativa entre Inoculante e Fungicida da ANOVA a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas, comparando os tratamentos de inoculação, e médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas, comparando a utilização de fungicida, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). (n = 5 repetições).

Nota-se que as plantas que tiveram as sementes tratadas com o fungicida e inoculadas com *Azospirillum brasilense* na dose recomendada apresentaram maior comprimento de raiz (CR) (Tabela 4). No entanto, na ausência do fungicida, as plantas, apresentaram maior CR sob ambas as doses de inoculante. Este comportamento mostra o efeito negativo que o fungicida tem sobre a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*. Munareto et al. (2018), ao avaliarem a compatibilidade de *A. brasilense* com fungicida, na cultura de trigo, verificaram que o comprimento da raiz diminuiu quando as sementes foram tratadas com fungicida (Difenoconazole – 150 mL por 100 kg de sementes) para a cultivar TBIO Itaipu.

Santos et al. (2020), estudando a compatibilidade do tratamento de sementes de milho cultivar Agroceres AG9010 PRO VT com o pesticida Standak™ Top (i.e. inseticida Fipronil 25% + fungicidas Pyraclostrobin 2,5% + Thiophanate-methyl 22,5%) e a aplicação de inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense*, composto das estirpes AbV5 e AbV6, demonstraram que um dos efeitos mais pronunciados da inoculação de *A. brasilense* na morfologia radicular foi a proliferação de pelos radiculares e seu comprimento, os quais são importantes para a absorção de água e nutrientes.

Os microrganismos do solo constituem a principal fonte de microrganismos mutualistas, capazes de colonizar a rizosfera das plantas no solo (Hardoim et al., 2012; Bakker et al., 2015; Figueiredo dos Santos et al., 2021). Movendo-se através do contínuo solo-rizosfera, a disponibilidade e a composição dos exsudados radiculares são as principais forças seletivas que estimulam a proliferação de certos grupos bacterianos específicos, moldando a microbiota rizosférica (Baudoin et al., 2003; Bakker et al., 2015; Figueiredo dos Santos et al., 2021).

Acredita-se que as populações bacterianas selecionadas tenham mais chances de colonizar a superfície da raiz (epifiticamente) e o tecido interno da raiz (endofiticamente). A seleção de bactérias endofíticas a partir da diversidade microbiana do solo, que é enriquecida por exsudatos radiculares, é amplamente reconhecida (Bulgarelli et al., 2012). Além disso, vários estudos mostram a importância das bactérias endofíticas, que são transmitidas pelas sementes, para auxiliar durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Nelson, 2017). Bactérias transmitidas

verticalmente pelas sementes têm sido extensivamente relatadas para diferentes espécies de plantas. Truyens et al. (2015) revisaram detalhadamente os mecanismos relacionados à dinâmica da comunidade bacteriana e à colonização de sementes.

Os eventos de germinação das sementes modulam a composição da comunidade microbiana, o que, em última análise, influencia o desempenho do crescimento da plântula. Johnston-Monje e Raizada (2011) demonstraram que o gênero *Zea* apresenta uma microbiota central, que é conservada durante a evolução, domesticação e migração do milho.

No entanto, atualmente, há a hipótese de que o melhoramento moderno do milho, sob condições de utilização de fungicidas, pode ter eliminado microrganismos endofíticos, especialmente microrganismos capazes de atuar no controle biológico (Mousa et al., 2015). De modo similar, o uso de pesticidas no tratamento de sementes pode afetar a sobrevivência de bactérias utilizadas como inoculantes e o crescimento vegetal (Santos et al., 2020).

Recentemente, Dias (2023) isolou bactérias endofíticas de sementes de milho, cultivar AG1051 (dados não publicados). No entanto, o potencial destas bactérias endofíticas em promover a germinação, o crescimento e o desenvolvimento do milho, cultivar AG1051, ainda não foi determinado. Porém, já foi demonstrado para outras cultivares que, à medida que as sementes começam a germinar, os microrganismos endofíticos das sementes podem ser importantes para o estabelecimento das plântulas, conforme demonstrado para o milho, cultivares PR38F70, W22, Pioneer-inbred line e cultivar desconhecida (Rijavec et al., 2007), além de arroz (Kaga et al., 2009; Mano et al., 2006) e eucalipto (Ferreira et al., 2008).

Observando o número de raízes (NR), as plantas de milho da cultivar AG1051, cujas sementes foram inoculadas com *A. brasilense*, alcançaram o melhor resultado sob ambas as doses de inoculante, quando não foram tratadas com fungicida (Tabela 4). Entre as doses de inoculante testadas, as plantas que tiveram as sementes inoculadas com a dose recomendada e sem o tratamento com fungicida apresentaram o NR 1,38% maior que aquelas tratadas com fungicida. Esse resultado mostra que a inoculação com *A. brasilense* promove aumento da produção de raízes laterais, auxiliando o desenvolvimento das plantas (Alikhani et al., 2007; Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014). Sabe-se que o uso de fungicidas é fundamental para o estabelecimento da cultura, no entanto, observa-se que o uso de fungicida associado à inoculação reduziu o NR. Portanto, é necessária a busca por métodos de prevenção e controle de patógenos,

capazes de substituir o uso de fungicidas, que sejam compatíveis com a inoculação (Chiaradia; Wordell Filho, 2012).

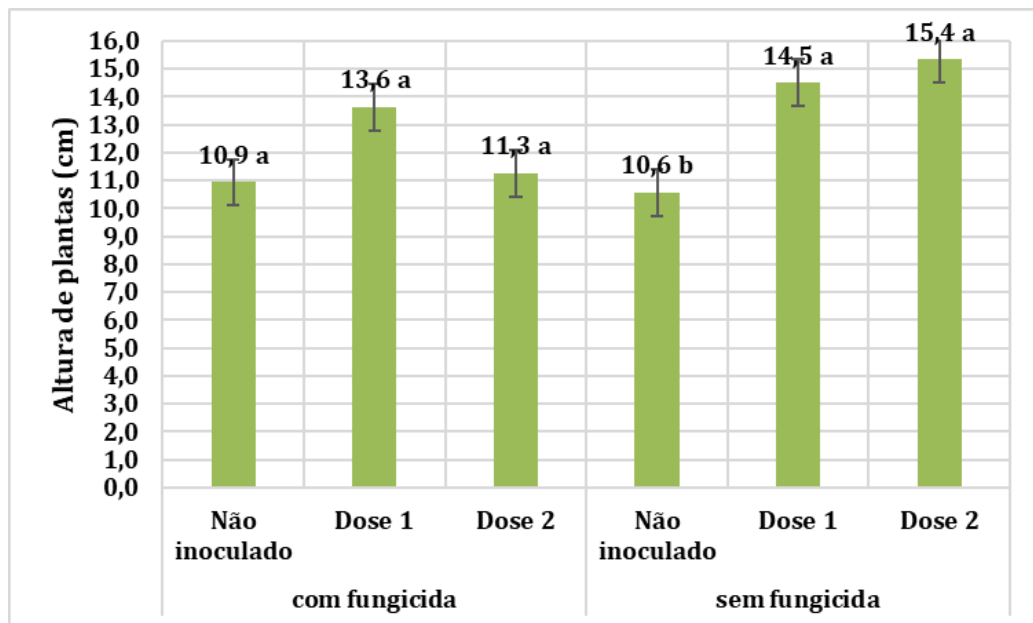
As plantas que tiveram as sementes inoculadas com ambas as doses do inoculante produziram mais massa seca da raiz (MSR) e massa seca das folhas (MSF), quando comparadas às plantas não inoculadas. Essa maior produção de matéria seca acontece pela capacidade de a bactéria *A. brasilense* promover o crescimento das plantas. Habitualmente, a inoculação dessa bactéria proporciona acréscimo de matéria seca e acúmulo de N nas plantas e nos grãos (Camargo et al., 2022). Em alguns estudos, a inoculação de sementes com *A. brasilense* promoveu maior índice de massa seca da raiz e parte aérea, constatando a promoção do crescimento da planta. Porto et al. (2020), por exemplo, observaram que a inoculação de sementes de milho, cultivar BM 3063, com inoculante comercial à base de *A. brasilense* (estirpe AbV5), promoveu ganho percentual de 38,53% na matéria fresca da parte aérea, 135,77% na matéria fresca da raiz, 17,45% na matéria seca parte aérea, 233,20% na matéria seca da raiz e 5,67% no comprimento de raiz.

No presente trabalho, embora tenha sido observada maior produção de MSR de plantas não tratadas com fungicida na ausência de inoculação quando as sementes foram inoculadas com ambas as doses de inoculante, não se observou diferença na produção de MSR de plantas tratadas e não tratadas com fungicida. Comportamento semelhante foi observado para a produção de MSF (Tabela 4).

A interação entre os fatores fungicida x inoculação foi significativa a 8% para altura de plantas. As plantas mostraram-se mais altas quando foram inoculadas, sem o tratamento com fungicida (Figura 2).

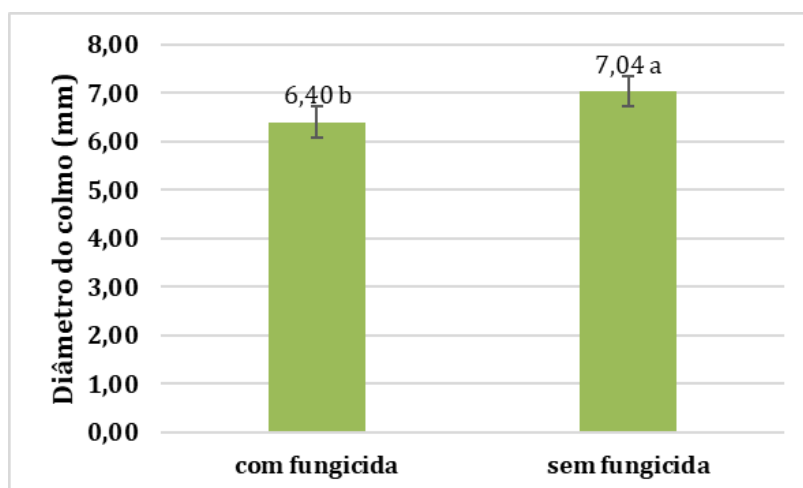
Camargo et al. (2022) observaram que a inoculação de sementes de milho da variedade 20A78PW, com um inoculante comercial à base de *A. brasilense*, composto pelas estirpes AbV5 e AbV6, promoveu maior altura de plantas, confirmando dados de Lopes (2016), que verificou que, independentemente do método de inoculação diretamente na semente e dirigida no sulco, *A. brasilense* proporcionou maior altura média das plantas de milho quando foram inoculadas.





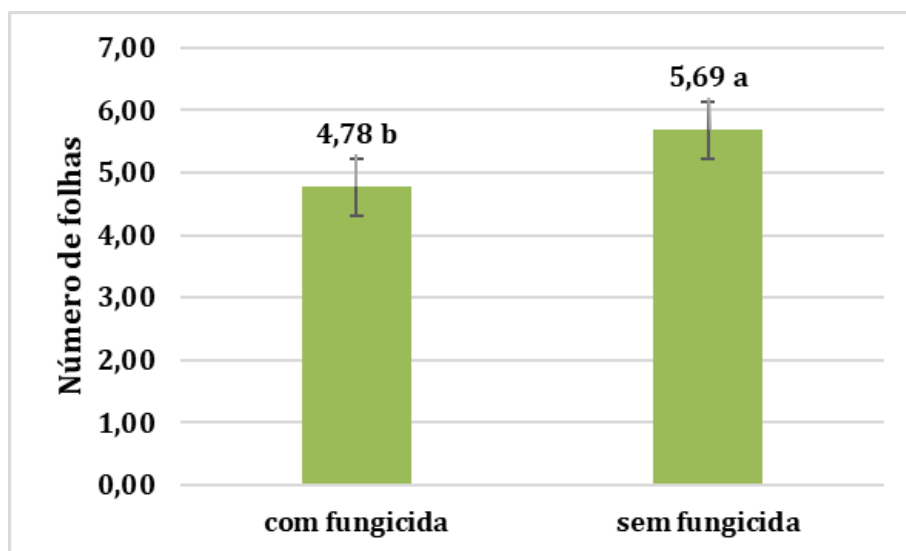
**Figura 2.** Altura de plantas (cm) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de *A. brasilense*. Dose 1 = 100 mL ha<sup>-1</sup>. Dose 2 = 200 mL ha<sup>-1</sup>. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 5 repetições)

Analisando o diâmetro do colmo (DC) e o número de folhas (NF), não foi observada interação entre os fatores ‘fungicida x inoculação’. No entanto, o fator fungicida mostrou-se significativo isoladamente para DC com  $P < 0,05$  (Figura 3) e NF com  $P < 0,01$  (Figura 4). O uso do fungicida isoladamente reduziu o diâmetro do colmo do milho AG1051.



**Figura 3.** Diâmetro do colmo (mm) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 15 repetições)

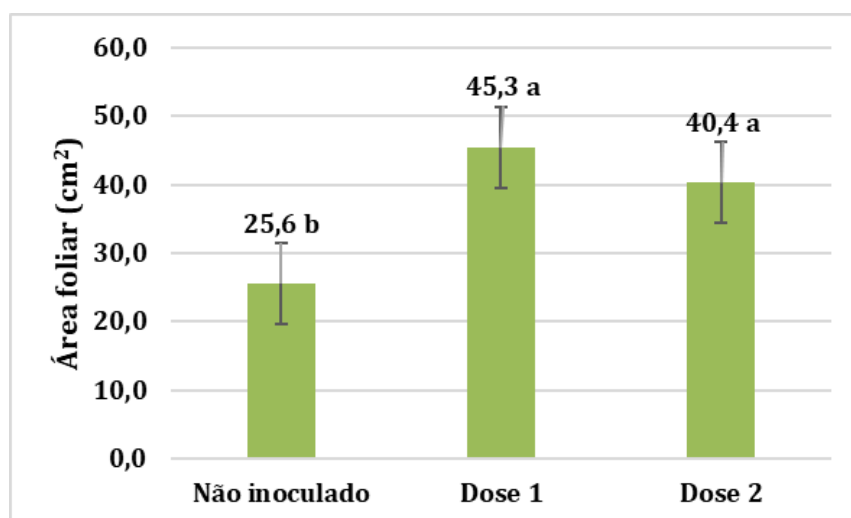
De modo semelhante ao DC, analisando o número de folhas, não foi observada interação entre os fatores fungicida x inoculação. No entanto, o fator fungicida mostrou-se significativo isoladamente ( $P < 0,01$ ) (Figura 4), sendo observado maior número de folhas nas plantas cujas sementes não foram tratadas com o fungicida Maxim XL.



**Figura 4.** Número de folhas de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão ( $n = 15$  repetições)

Rosa (2020), estudando a qualidade fisiológica de sementes de milho, cultivar BRS 106, submetidas a diferentes tratamentos químicos e à aplicação de bioestimulantes, observou que o tratamento das sementes com fungicida composto por Carboxina + Thiram ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ), juntamente com o inseticida composto por Tiodicarbe ( $450 \text{ g L}^{-1}$ ) + Imidacloprido ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ) e o fertilizante composto por 10% de Zn e 4% de S, reduziu em 34% o número de plântulas normais em comparação com o tratamento testemunha.

Analisando a área foliar (AF), não foi observada interação entre os fatores fungicida x inoculação. No entanto, o fator inoculação mostrou-se significativo isoladamente ( $P < 0,01$ ), sendo observada maior AF nas plantas cujas sementes foram inoculadas com *A. brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6. A AF das plantas inoculadas com a Dose 1 e Dose 2 mostrou-se 77% e 57,8% superior ao tratamento não inoculado, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Área foliar (cm<sup>2</sup>) de milho AG1051 com sementes inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense*. Dose 1 = 100 mL ha<sup>-1</sup>. Dose 2 = 200 mL ha<sup>-1</sup>. As barras de erro representam  $\pm$  o erro padrão (n = 10 repetições)

Analisando as variáveis massa fresca da raiz (MFR), massa fresca do colmo (MFC) e massa fresca das folhas (MFF), observa-se que não houve interação entre os fatores ‘fungicida x inoculação’. No entanto, as três variáveis mostraram significância para os fatores fungicida e inoculação, isoladamente. Na ausência do tratamento com fungicida, as plantas mostraram valores de MFR 25%, MFC 29% e MFF 21% superiores às plantas tratadas com fungicida (Tabela 5). Este comportamento demonstra a inibição causada pelo fungicida. Quando inoculadas, sob ambas as doses de inoculante, as plantas apresentaram maiores valores de MFR, MFC e MFF (Tabela 5).

**Tabela 5.** Massa fresca da raiz (MFR), massa fresca do colmo (MFC) e massa fresca das folhas (MFF) de milho AG1051 com sementes tratadas e não tratadas com fungicida com inoculação de *A. brasilense*

Variáveis	Fungicida		Inoculação		
			Não inoculado	Dose 1 (100 mL ha <sup>-1</sup> )	Dose 2 (200 mL ha <sup>-1</sup> )
	COM	SEM			
MFR (g)	0,62 b	0,78 a	0,61 B	0,75 A	0,72 A
MFC (g)	2,16 b	2,80 a	2,01 B	2,65 A	2,78 A
MFF (g)	2,72 b	3,30 a	2,11 B	3,62 A	3,29 A

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas, comparando o fator fungicida (n = 15 repetições), e médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas linhas, comparando o fator inoculação (n = 10 repetições), não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

Embora não tenha sido observada interação entre os fatores ‘fungicida x inoculação’ para as variáveis diâmetro do colmo, número de folhas, área foliar, massa fresca da raiz, massa fresca do colmo e massa fresca das folhas, a inibição causada pelo fungicida foi amenizada pela inoculação com *Azospirillum brasilense*, observando o comportamento das variáveis comprimento da raiz, número de raízes, massa seca da raiz e massa seca da parte aérea, destacando o papel central que esta espécie bacteriana pode desempenhar na mitigação do estresse abiótico, conforme demonstrado para pesticidas (Santos et al., 2020) e salinidade (Ribaud et al., 2006; Fukami et al., 2017, 2018). Além disso, é importante ressaltar que, embora não tenha sido observada interação entre os fatores estudados para os parâmetros relacionados à parte aérea neste período inicial de desenvolvimento da cultura (35 dias após a semeadura), é necessário considerar que as plantas foram cultivadas sob condições ótimas controladas da casa de vegetação. Em condições de campo, o número de raízes, o número de pelos radiculares e o comprimento de raízes e dos pelos radiculares, nas plantas inoculadas podem amenizar a suscetibilidade das plantas às condições de estresse hídrico e melhorar a nutrição do milho, podendo alcançar bons resultados de produtividade. Neste cenário atual de mudança climática global, estas características são de extrema importância, principalmente com o aumento do número de episódios de seca, que têm sido registrados em todas as regiões brasileiras.

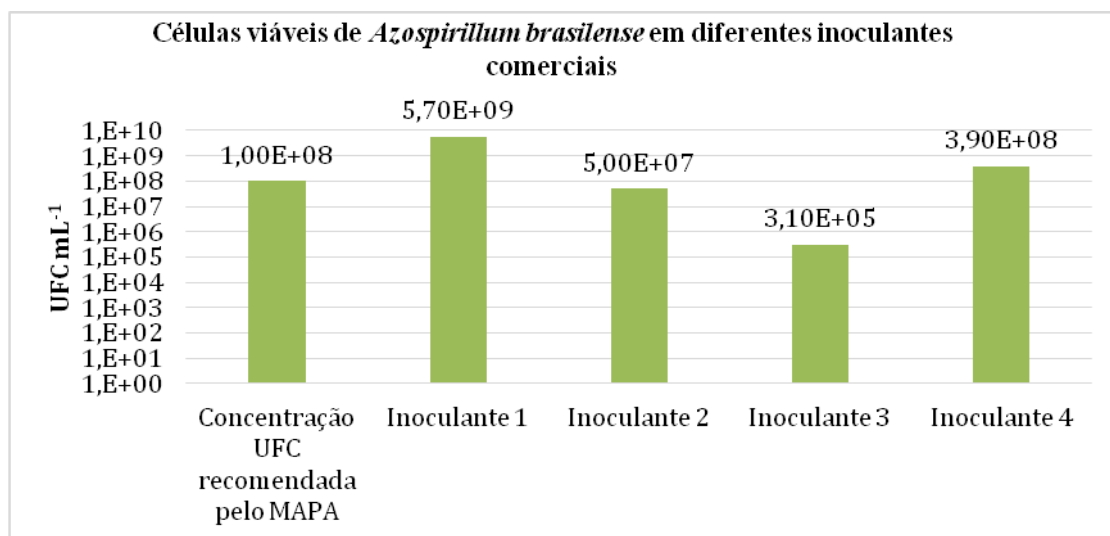
#### **4.3 Controle de qualidade de inoculantes de *Azospirillum brasilense***

A tecnologia de inoculação de sementes com microrganismos promotores de crescimento de plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio é uma prática agrícola já bem estabelecida mundialmente. A adoção dessa tecnologia vem diminuindo custos e impactos ambientais da produção de alimentos em todo o mundo. No entanto, o sucesso desta tecnologia está diretamente associado a um programa de controle de qualidade eficiente, ou seja, o sucesso da tecnologia é dependente da garantia do número de células viáveis do microrganismo recomendado como inoculante para as culturas e da certificação da ausência ou presença insignificante de microrganismos contaminantes no inoculante.

Analisando a concentração de células viáveis de *Azospirillum brasilense* em quatro inoculantes comerciais diferentes produzidos no Brasil (Figura 6), observou-se que, em dois produtos comerciais, o valor de unidades formadoras de colônia (UFC)

estava abaixo do recomendado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), cujo valor mínimo é de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> para bactérias (Brasil, 2010).

Aproximadamente 85% da produção mundial de grãos agrícolas faz o controle de uma variedade de pragas e doenças utilizando pesticidas (Kim et al., 2017). O uso de pesticidas, especialmente de fungicidas e de inseticidas, no tratamento de sementes é um dos principais desafios para o sucesso do emprego de inoculantes microbianos na produção agrícola (Hungria et al., 2005; Campo et al., 2009; Hungria; Mendes, 2015).



**Figura 6.** Número de células viáveis por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL de inoculante pela técnica de contagem da microgota, em meio Rojo Congo modificado. (n = 27 réplicas)

A incompatibilidade entre rizóbios e pesticidas tem sido amplamente relatada já há algum tempo, o que causa uma redução acentuada na sobrevivência das células bacterianas quando em contato com os produtos químicos, reduzindo a nodulação e a produção de soja. Portanto, os tratamentos de sementes com pesticidas e inoculantes demonstram incompatibilidade na grande maioria das vezes (Campo et al., 2009; Zilli et al., 2010; Hungria; Mendes, 2015; Elslahi et al., 2014). No entanto, para o cultivo do milho, são escassos os trabalhos sobre o tratamento de sementes com pesticidas e a inoculação com *Azospirillum* (Pereira et al., 2019; Santos et al., 2020).

Em um estudo, Pereira et al. (2019) conduziram dois experimentos, um em laboratório e outro em campo, para comparar o rendimento da cultura e o potencial fisiológico de sementes de milho inoculadas via tratamento químico industrial com a inoculação padrão de sementes (i.e. feita antes da semeadura). Foi observado que o

tratamento controle, cujas sementes não foram tratadas, apresentou germinação e vigor superiores, indicando efeito adverso do tratamento com fungicida e inseticida sobre a qualidade fisiológica das sementes. Analisando a produtividade, os autores concluíram que a inoculação feita momentos antes da semeadura apresentou resultados melhores que aqueles observados sob a inoculação das sementes juntamente com a aplicação dos defensivos químicos.

Deve-se ressaltar que a Instrução Normativa número 30, de 12 de novembro de 2010 do MAPA, que estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza, oficialmente não adota a contagem em meio sólido em placa de Petri, usando a técnica da microgota, que foi empregada neste estudo. No entanto, a técnica da microgota é eficiente, mais rápida e mais econômica para a contagem de células viáveis por UFC de bactérias (Miles; Misra, 1938; Barbosa et al., 2014), conforme demonstrado recentemente por Di Salvo et al. (2022), que propuseram a técnica da microgota como método alternativo para a contagem de células viáveis de *Azospirillum* spp. como um protocolo da Rede de Controle de Qualidade de Inoculantes da Argentina (REDCAI, sigla em espanhol). A técnica da microgota comparada à técnica padrão do espalhamento utiliza menos placas de Petri e permite trabalhar com um elevado número de replicatas.

A qualidade comprometida de inoculantes comerciais à base de *Azospirillum*, com concentração de células abaixo da recomendada pelo MAPA, conforme observado na Figura 6, revela a necessidade do estabelecimento de um sistema de controle de qualidade padrão a nível nacional. A preocupação com a qualidade de inoculantes em diferentes países tem sido comprovada em vários estudos, os quais têm mostrado que a maioria dos produtos tem qualidade comprometida, apresentando confiabilidade contestável sob condições de campo (Olsen et al., 1994a-b, 1996; Okon; Itzigsohn, 1995; Gomez et al., 1997; Vessey, 2003; Tarbell; Koske, 2007; Herridge, 2008).

As pesquisas com inoculantes, especialmente, contendo rizóbios e *Azospirillum*, no Brasil têm longa tradição, o que proporcionou a criação de uma legislação para o controle de qualidade de inoculantes produzidos no país. De acordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), a concentração mínima de células de *Azospirillum* por grama ou mililitro de inoculante é  $10^8$ , além disso, o inoculante não deve apresentar contaminantes a partir da diluição  $10^{-5}$ , contendo apenas cepas elite, com eficiência agrônômica reconhecida (Brasil, 2010).

A produção industrial de inoculantes é um processo complexo. No Brasil, a produção de inoculantes vem sofrendo melhorias, especialmente, nas últimas duas décadas, colocando à disponibilidade dos produtores agrícolas brasileiros, produtos de alta qualidade, com concentração celular adequada, sem contaminantes e com custo relativamente baixo. No entanto, percebe-se que ainda há a necessidade de melhorias no processo de produção e controle para garantir o padrão estabelecido pela legislação.

## **CONCLUSÃO**

O tratamento de sementes de milho com fungicida MAXIM® XL afetou o desenvolvimento de plântulas de milho AG1051. Os benefícios da inoculação de sementes de milho com *A. brasilense*, como o desenvolvimento da raiz, podem ser prejudicados pelo tratamento de sementes com fungicida. Além disso, alguns inoculantes comerciais apresentaram quantidade de células viáveis de *A. brasilense* abaixo da concentração recomendada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), o que pode afetar os benefícios da inoculação. Considerando as variáveis analisadas, a dose comercial recomendada obteve o melhor desempenho.

## REFERÊNCIAS

- ABENDROTH, L. J.; ELMORE, R. W.; BOYER, M. J.; MARLAY, S. K. **Corn growth and development**. Iowa: Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension, Ames, Iowa, 2011.
- ALIKHANI, H. A.; ABBAS-AKBARI, G.; MEHDI ARAB, S.; ALIKHANI, H. A.; ALLAHDADI, I.; ARZANESH, M. H.; Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 4, p. 523–529, 2007.
- ANDRADE, M. M. de. **Cultivares de milho verde irrigado por pivô central cultivado em diferentes espaçamentos e níveis de desfolha em domínio de cerrado**. 2018. 50p. Dissertação (Mestrado em Irrigação no Cerrado) – Instituto Federal Goiano, Campus Ceres, GO, 2018.
- BAKKER, M. G.; CHAPARRO, J. M.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J. M. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, v. 392, p.115–126, 2015. DOI:10.1007/s11104-015-2446-0
- BALDIGA TONIN, R. F.; LUCCA FILHO, O. A.; LABBE, L. M. B.; ROSSETTO, M. Potencial fisiológico de sementes de milho híbrido tratadas com inseticidas e armazenadas em duas condições de ambiente. **Scientia Agropecuaria**, v.5., n.1, p. 7–2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.01>
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. de 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, p. 104276, fev. 2022.
- BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABI, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). **Campo Digital**, v. 5, n. 1, p. 56–59, dez. 2010.
- BAUDOIN, E; BENIZRI, E; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biol Biochem**, v. 35, p. 1183–1192, 2003.
- BONI, F. B.; CARVALHO, I. R., NARDINO, M.; FERRARI, M.; DEMARI, G. H.; SZARESKI, V. J.; PELEGRIN, A. J.; SALTOS, N. L.; SANTOS, O. P.; SOUZA, V. Q. Qualidade fisiológica de sementes e rendimento de grãos da cultivar puita inta cl. **Revista Sodebras**, v. 11, n.126, p. 93-98, 2016.
- BRANCO, J. DOS S.; PRATES JÚNIOR, P. Fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável de forragem. **Revista de Educação Tecnológica e Científica**, v. 03, n. 01, p. 101–104, 2022.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº. 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: 20 jan. 2024.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 30, de 12 de novembro de 2010**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos->



agricolas/fertilizantes/legislacao/in-30-2010-dou-17-11 -10-metodo-inoculantes.pdf>.  
Acesso em: 20 jan. 2024.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPI, K.; VAN THEMAAT, E. V. L.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F.; RAUF, P.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; SCHMELZER, E.; PEPLIES, J.; GLOECKNER, F. O.; AMANN, R.; EICKHORST, T.; SCHULZE-LEFERT, P. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v.488, p. 91-95, 2012.

CAMARGO, K. C.; CASTO, B.; MENEZES, L. de M.; LOPES, M. M. Inoculação com *Azospirillum brasilense* para a produção de milho para silagem. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e6611326165, 12 fev. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26165>

CAMPO, R. J.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v.48, p.154-163, 2009. DOI:10.1007/BF03179994

CARVALHO, G. A. B.; FERREIRA, E.; HUNGRIA, M. A importância do controle de qualidade dos inoculantes. **V Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, p. 64–66, 2010.

CARVALHO, G. A. B.; HUNGRIA, M.; MIURA, L. M. Análise e controle da qualidade de inoculantes microbianos de interesse agrícola: bactérias fixadoras de nitrogênio. **IV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, v. 4, p. 86–90, 2009.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, 10 jun. 2014.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G. dos; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. S. Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-Açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595–1602, dez. 2015.

CHIARADIA, L. A.; WORDELL FILHO, J. A. Importância do tratamento de sementes no cultivo do milho. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 25, n. 2, 2012.

CHIESA, A. C. M.; SISMEIRO, M. N. dos S.; PASINI, A.; ROGGIA, S. Tratamento de sementes para manejo do percevejo-barriga-verde na cultura de soja e milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 301–308, abr. 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000400002>

CHOTTE, J-L.; SCHWARTZMANN, A.; BALLY, R.; MONROZIER, L. J. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1083–1092, ago. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00041-X)

CICILIATO, A. L.; CASIMIRO, E. L. N. Inoculante *Azospirillum brasilense* via foliar associado a diferentes fertilizantes foliares na cultura do milho. **Revista Cultivando o Saber**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

COELHO, A. M. **Nutrição e Adubação do Milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

CONAB. **Boletim de Monitoramento Agrícola**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 25 de outubro de 2023.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001>

DI SALVO, L. P. et al. The drop plate method as an alternative for *Azospirillum* spp. viable cell enumeration within the consensus protocol of the REDCAI network. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 54: 152-157. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.05.002>.

DSMZ Prokaryotic nomenclature up-to-date. 2024. Disponível em: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>. Acesso em: 27 jan 2024.

EISINGER, S. M.; PARANHOS, J. T. **Botânica agrícola**. Santa Maria: UFSN, CCNE, Departamento de Biologia, 2017.

ELSLAHI, R. H.; OSMAN, A. G.; SHERIF, A. M.; ELHUSSEIN, A. A. Comparative study of the fungicide Benomyl toxicity on some plant growth promoting bacteria and some fungi in pure cultures. **Interdiscip Toxicol**, v.7, p. 12–16, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0002>.

FAO. **Food Agriculture and Organization - Maize Food Agriculture and Organization**. 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/maize/en/>. Acesso em: 29 out. 2023.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 14 out. 2023.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C; LACAVAL, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiol Lett**, v.287, p.8–14. 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer Analysis System To Fixed Effects Split Plot Type Designs. *Brazilian Journal of Biometrics*, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 529–535, 2019. DOI: 10.28951/rbb.v37i4.450.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Sugestão para alterações nos meios de cultura e análises de *Azospirillum* nas instruções normativas Nº 30 e Nº 13 do MAPA. **Anais da XVII RELARE: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola**, v. 1, p. 39–40, jun. 2016.

FIGUEIREDO DOS SANTOS, L.; SOUTA, J. F.; SOARES, C. P.; ROCHA, L. O.; SANTOS, M. L. C.; GRATIVOL, C.; ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L. Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 97, n.4, 2021. DOI: 10.1093/femsec/fiab024. PMID: 33571355.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M. SILVA, K.; MOREIRA, F.M.S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.66, n.5, p.667-676, 2009.

FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Fixação Biológica de Nitrogênio em Agroecossistemas da Região Semiárida do Nordeste. In: SOUZA, H. A. de; LEITE, L.

- F. C.; MEDEIROS, J. C. (Ed.). **Solos sustentáveis para a agricultura no Nordeste**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. Cap. 2, p.375-408.
- FUTREL, M.C.; KILGORE, M. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*, Beltsville, v.53, p.213-315, 1969.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 13 dez. 2016. DOI:10.1186/s13568-015-0171-y
- FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 4 dez. 2018.
- FUKAMI, J.; OLLERO, E. 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**, vol. 7, p. 1–13, 2017.
- GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; RODRIGUES, W. L.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J. Nitrogen fertilisation efficiency and wheat grain yield affected by nitrogen doses and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 69, n. 7, p. 606–617, 2019. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1628293>
- GARCIA, A.; ANDRÉ, R. G. B.; GALBIATTI, J. A.; TANNOUS, S. Análise de crescimento de uma cultura de milho submetida a diferentes regimes hídricos. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 239–251, 17 abr. 2008. <http://dx.doi.org/10.3738/1982-227860>
- GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C. **Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho**. (Circular Técnica, 74). Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.
- GOMEZ, M.; SILVA, N.; HARTMANN, A.; SAGARDOY, M.; CATROUX, G. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 13, p.167-173, 1997.
- GONDIM, A. R. de O.; PRADO, R. de M.; FONSECA, I. M.; ALVES, A. U. Crescimento inicial do milho cultivar BRS 1030 sob omissão de nutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 706–714, 2016. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201663050016>
- HARDOIM, P. R.; HARDOIM, C. C. P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, 2012. e30438. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>
- HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121–129, 2001.
- HERRIDGE, D. F. Inoculation technology for legumes: In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. (eds). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Springer, Dordrecht, p.77-115, 2008.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347p.
- HUNGRIA, M; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H.. Inoculant preparation, production and application. In: NEWTON, W. E. (ed.), **Nitrogen**

**fixation: origins, applications and research progress.** Dordrecht, Springer, 2005. Chapter 11. p.223-254. DOI: [https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6_11).

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis?, In: DE BRUIJN, F. J. (ed.), **Biological nitrogen fixation.** Hoboken, New Jersey, p. 1009-102, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>.

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, n. 5, p. 2969–2980, 17 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/agj2.21150>

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, 13 jun. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **PLoS ONE**, v.6, e20396, 2011.

KIM, K-H.; KABIR, E.; JAHAN, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci Total Environ**, v.575, p.525–535, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.

LEMOS, E. F.; RODRIGUEZ, A. P. da M.; ALVES, T. L. Doses e modo de aplicação de inoculante com *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho. **Revista Ciência et Praxis**, p. 1983–912, 2020.

LOPES, M. M. **Pulverização dirigida no sulco e inoculação na semente de milho com *Azospirillum brasilense*.** 2016. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão, Santa Maria - RS, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/13000>>. Acesso em: 10 jan. 2024

LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; FIGUEIREDO, G. G. O.; OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 527, 15 abr. 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n2p527

LÓPEZ-REYES, L.; CARCAÑO, M.; LILIA, T-L.; LA ROSA, G. M.; TAPIA-HERNANDEZ, A. Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. mexicana. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 50, n. 13–14, p. 727–743, 27 ago. 2017. DOI: 10.1080/03235408.2017.1372247

LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on Endogenous Gibberellin Content and Growth of Maize (*Zea mays* L.) Treated with Uniconazole. **Symbiosis**, Balaban, Philadelphia/Rehovot, v. 23, p.63-72, 1997.

MAHANTY, T.; BHATTACHARJEE, S.; GOSWAMI, M.; BATTACHARYYA, P.; DAS, B.; GHOSH, A.; TRIBEDI, P. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3315–3335, 1 fev. 2017. DOI: 10.1007/s11356-016-8104-0

MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds

of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, v.21, n.2, p. 86–100, 2006. DOI:10.1264/jsme2.21.86

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117–123, fev. 2015. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562010015>

MERLOTI, L. F.; MENDES, L. W.; PEDRINHO, A.; SOUZA, L. F.; FERRARI, B. M.; TSAI, S. M. Forest-to-agriculture conversion in Amazon drives soil microbial communities and N-cycle. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, p. 107567, out. 2019. DOI: 10.1016/j.soilbio.2019.107567

MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Eds.) **Bioinsumos na cultura da soja**. 1.ed. Brasília-DF: Embrapa, 2022. 550p.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Trichoderma uso na agricultura. Brasília: Embrapa, 2019. 538 p.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology and Infection**, v. 38, n. 6, p. 732–749, 15 nov. 1938.

MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STURMER S.L. **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. 1.ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 352 p.

MOUSA, W. K.; SHEARER, C. R.; LIMAY-RIOS, V.; ZHOU, T.; RAIZADA, M. N. Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.805, 2015.

MUNARETO, J. D.; MARTIN, T. N.; MÜLLER, T. M.; NUNES, U. R.; ROSA G. B.; GRANDO, L. F. T. Compatibility of *Azospirillum brasilense* with fungicide and insecticide and its effects on the physiological quality of wheat seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 855, 15 mar. 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n2p855

NELSON, E. B. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. **Plant Soil**, v. 422, p.7–34, 2017.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnol Adv**, v. 13, p. 415-424, 1995.

OLSEN, P. E.; RICE, W. A.; BORDELEAU, L. M.; BIEDERBECK, V. O. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. **Plant Soil**, v. 161, p. 127-134, 1994a.

OLSEN, P. E.; RICE, W. A.; BORDELEAU, L. M.; DEMIDOFF, A. H.; COLLINS, M. M. Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in comercial legume inoculant made with nonsterile peat carrier. **Can J Microbiol**, v.42, p.72-75, 1996.

OLSEN, P. E.; RICE, W. A.; COLLINS, M. M. Biological contaminants in North American legume inoculants. **Soil Biol Biochem**, v.27, p. 699-701, 1994b.

ONU. **World Population Prospects**. 2019. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 427–451.

OSMAN, A.; SHERIF, A. M.; EL HUSSEIN, A. A.; MOHAMED, A. T. Sensitivity of some nitrogen fixers and the target pest *Fusarium oxysporum* to fungicide thiram. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 25–29, 1 mar. 2012. DOI:10.2478/v10102-012-0005-6

PALIWAL, R. L.; GRANADOS, G.; LATFITTE, H. R.; VIOLIC, A. D. **Tropical maize: improvement and production**. Roma: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, 2000. 363p.

PEREIRA, L. DE M.; PEREIRA, E. DE M.; REVOLTI, L. T. M.; ZINGARETTI, S. M.; MÔRO, G. V. Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 3, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150047>

PEREIRA, L. C.; CORREIA, L. V.; BRACCINI, A. L.; MARTELI, D. C. V.; MATERA, T. C.; PEREIRA, R. C.; SUZUKAWA, A. K. Tratamento industrial e pré-inoculação do milho com *Azospirillum* spp.: Potencial fisiológico das sementes e produtividade. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 18, n. 2, p. 245-256, 2019.

PIGNATI, W. A.; SOUZA E LIMA, F. A. N.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

PINTO, N.F.J.A. Tratamento das sementes com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). **Tecnologia para produção de sementes de milho**. p.43-47, 1993.

PORTO, L. S.; COSTA, R. R. G. F.; SILVA, F. V.; ROCHA, A. F. S. Micro-organismos eficazes e *Azospirillum brasilense*: efeitos sobre a produtividade do milho. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 9, n. 2, 2020.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200008>

RANI, L.; THAPA, K.; KANOJIA, N.; SHARMA, N.; SINGH, S.; GREWAL, A. S.; SRIVASTAV, A. L.; KAUSHAL, J. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, fev. 2021. DOI:10.1016/j.jclepro.2020.124657

RIBAUDO, C. M.; KRUMPHOLZ, E. M.; CASSÁN, F. D.; BOTTINI, R.; CANTORE, M. L.; CURÁ, J. A. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 175–185, 2006.

RIBEIRO, B. S. M. R.; ZANON, A. J.; STRECK, N. A.; FRIEDRICH, E. D.; PILECCO, I. B.; ALVES, A. F.; PUNTEL, S.; SARMENTO, L. F. V.; STRECK, I. L.; INKLMAN, V. B.; PETRY, M. T.; MARTINS, J. D.; BORTOLUZZI, M. P.; LOOSE, L. H.; BRUNETTO, G.; MARIN, F. R.; ANTOLIN, L. A. S.; BREDEMEIER, C.;

- VIAN, A. L.; OLIVEIRA, L. F. R. de. **Ecofisiologia do milho visando altas produtividades**. 1.ed. Santa Maria: ESALQ, 2020. 230p.
- RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Can J Microbiol**, v. 53, p. 802–808, 2007.
- RODRIGUES, T. F.; BENDER, F. R.; SANZOVO, A. W. S.; FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Impact of pesticides in properties of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiotic performance with soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 172, 17 nov. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02949-5>
- ROMAN, E. S.; PINTO, J. J. O. Antídotos para herbicidas e seu modo de ação. **Revista Cultivar**, v.1, p.16-17, 2003.
- ROSA, C. C. **Qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas a tratamento químico e bioestimulantes**. 2020. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Brasília – DF, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020.
- ROSENTHAL, M. D.A.; MISTURA, C. C.; FREITAS, D. A. C.; BRANCO, J. S. C.; MORAES, D. Análise da germinação e crescimento de plântulas de arroz sob o efeito do protetor de sementes. *In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*, 25, 2006.
- SANTOS, L. F.; SOUTA, J. F.; SOARES, C. P.; ROCHA, L. O.; SANTOS, M. L. C.; GRATIVOL, C.; ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L. Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 4, 2021. DOI: 10.1093/femsec/fiab024.
- 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, p. 1–8, 10 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8833879>
- 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, n. 1, p. 205, 21 dez. 2019.
- SILVA, D. C.; COSTA, N.; ARAÚJO, J. C.; SILVA, A. V.; XAVIER, G. F.; FERREIRA, J. P.; OLIVEIRA, L. C.; ALVES, G. C. Avaliação da adubação nitrogenada associada à inoculação com bactérias *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 99862–99881, 26 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n10-344>
- SILVA, K. M. D. J.; VON PINHO, R. G.; VON PINHO, E. V. R.; OLIVEIRA, R. M.; SANTOS, H. O.; BORGES, R. B. C.; SILVA, T. S.; PEREIRA, D. S. Desempenho agrônômico da cultura do milho a partir do uso de sementes quimicamente tratadas com fungicidas e inseticidas e submetidas a diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 18, n. 1, p. 112–122, 16 ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v18n1p112-122>
- SOARES, C. R. F. S.; HERNÁNDEZ, A. G.; SILVA, E. P.; SOUZA, J. E. A.; BONFIM, D. F.; ZABOT, G. L.; FERREIRA, P. A. A.; BRUNETTO, G. Applications and Market of Micro-Organism-Based and Plant-Based Inputs in Brazilian Agriculture. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 3844, 14 nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12223844>

- SOUZA, J. C.; CASTRO, J. N. Análise de crescimento e desenvolvimento da soja coinoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 14, n. 1, p. 156–167, 2022.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, jul. 2007.
- SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33–40, 8 jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.330>
- TARBELL, T. J.; KOSKE, R. E. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. **Mycorrhiza**, v.18, p.51-56, 2007.
- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, 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.
- TRUYENS, S.; WEYENS, N.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, p.40–50, 2015. DOI: doi:10.1111/1758-2229.12181
- VERONEZI, S. D. F.; RIBEIRO, L. M.; CECCON, G.; Uso de *Azospirillum brasilense* em milho safrinha solteiro e consorciado com *Brachiaria ruziziensis*; **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**; v. 12, n.4, p. 349-360, 2018.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.
- VOGEL, G. F.; MARTINKOSKI, L.; JADOSKI, S. O.; FEY, R. Efeitos na combinação de *Azospirillum brasilense* com fungicidas no desenvolvimento de trigo. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 73-80, 2015. DOI: 10.5935/PAeT.V8.N3.08
- ZHANG, J.; HUSSAIN, S.; ZHAO, F.; ZHU, L.; CAO, X.; YU, S.; JIN, Q. Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, n. 4, p. 1453–1465, 16 abr. 2018. DOI: 10.1007/s11368-017-1861-7
- ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p.335-338, 2010. DOI: 10.1590/S0100-204X2010000300015.