

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

BRENO AUGUSTO MORAES

EFEITO DE UMA NOVA ESTIRPE DE *Azospirillum brasilense* EXCRETORA DE
AMÔNIO EM MILHO CULTIVADO A CAMPO SOB DIFERENTES DOSES
E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

PONTA GROSSA
2026

BRENO AUGUSTO MORAES

EFEITO DE UMA NOVA ESTIRPE DE *Azospirillum brasilense* EXCRETORA DE
AMÔNIO EM MILHO CULTIVADO A CAMPO SOB DIFERENTES DOSES
E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, curso de Mestrado da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais. Linha de Pesquisa: Uso e manejo dos recursos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

PONTA GROSSA
2026

M827 Moraes, Breno Augusto

 Efeito de uma nova estirpe de *Azospirillum brasilense* excretora de amônio em milho cultivado a campo sob diferentes doses e métodos de inoculação / Breno Augusto Moraes. Ponta Grossa, 2026.

 60 f.

 Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

 1. Milho - Cultivo. 2. *Azospirillum brasilense*. 3. Bioinsumos agrícolas. 4. Fixação biológica de nitrogênio. 5. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. I. Etto, Rafael Mazer. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciência do Solo e Recursos Ambientais. III.T.

CDD: 631.8



BRENO AUGUSTO MORAES

“EFEITO DE UMA NOVA ESTIRPE DE *Azospirillum brasilense* EXCRETORA DE AMÔNIO EM MILHO CULTIVADO A CAMPO SOB DIFERENTES DOSES E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO”.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área: Ciência do Solo e Recursos Ambientais.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL MAZER ETTO**
Data: 04/05/2026 13:42:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto
Doutor em Ciências
UEPG

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO FAVERO CAIRES**
Data: 05/05/2026 11:49:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires
Doutor em Agronomia
UEPG

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL RUIZ POTMA GONCALVES**
Data: 06/05/2026 17:16:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Daniel Ruiz Potma Gonçalves
Doutor em Agronomia
EPAGRI

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grato pela minha vida e saúde, pelos momentos alegres – que não foram poucos – e por tantas oportunidades que surgiram desde o início da minha vida acadêmica, mas, agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida de cada uma das pessoas abaixo: familiares, amigos e todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão de mais esta etapa.

À minha esposa, Suelem, que com muita paciência e dedicação me ajudou em todas as etapas deste trabalho e, mesmo quando não diretamente envolvida, tornou nosso convívio e nosso lar um ambiente aconchegante para que eu pudesse me dedicar, em alguns momentos, exclusivamente às atividades acadêmicas.

À minha família, especialmente aos meus pais, Wilma e Daniel, que, entre 10 anos de idas e vindas de Mafra a Ponta Grossa, sempre me apoiaram e me deram o suporte necessário para alçar voo rumo a conquistas que nunca passaram pela minha mente.

Aos meus orientadores, professora Carolina e professor Rafael, que, entre experimentos, relatórios, reuniões, TCC e agora dissertação, souberam conduzir o trabalho com um profissionalismo ora quase paternal, tornando cada pesquisador em formação do LABMOM pessoas e profissionais cada vez melhores.

Aos meus colegas do LABMOM, obrigado por dissiparem qualquer tristeza ou tensão no ambiente que é nossa casa dentro da UEPG. Gostaria de citar nomes, mas corro o risco de pecar pelo esquecimento, então acreditem, se não guardo todos os nomes na memória é porque guardo cada um de vocês no coração.

Agradeço ainda à Universidade Estadual de Ponta Grossa, aos docentes, coordenadores, administradores e demais servidores. À agência de fomento CAPES, por tornar este trabalho possível.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria. ”

Khalil Gibran

RESUMO

A inoculação de milho com bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido estudada como estratégia para aumentar a eficiência das plantas e otimizar o uso do nitrogênio (N). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho agrônômico da estirpe *Azospirillum brasilense* TMA020, bem como investigar os efeitos do método (via semente, via sulco e via sulco+foliar) da dose de inoculação sobre parâmetros biométricos, componentes de produção, produtividade e concentração de N em plantas e grãos de milho, cultivado em segunda safra. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com estrutura fatorial incompleta, e adubação nitrogenada reduzida, incluindo tratamentos inoculados além de controles com a estirpe comercial AbV5/AbV6 e sem inoculação. As análises estatísticas foram realizadas por meio de testes de comparação de médias, regressão e contrastes planejados, adotando nível de significância de 10%. A comparação entre estirpes com a dose recomendada de inoculante não evidenciou diferenças significativas nas variáveis avaliadas. No entanto, a análise de dose dentro da estirpe TMA020 revelou resposta produtiva dependente da quantidade de inoculante, com melhor desempenho nas maiores doses. A dose de 200 mL ha⁻¹ apresentou superioridade em produtividade e variáveis de biomassa em relação à dose de 150 mL ha⁻¹. O método de aplicação não induziu diferenciação entre variáveis avaliadas. Conclui-se que o potencial agrônômico da estirpe TMA020 está associado à dose de aplicação, com evidências de resposta refletida na produtividade. Os resultados indicam que a inoculação pode aumentar a eficiência da cultura sem alterar proporcionalmente o crescimento estrutural ou o estoque absoluto de N, reforçando o papel do *Azospirillum* como modulador metabólico da planta.

Palavras-chave: Eficiência de uso de N; BPCV; Bioinsumos agrícolas; Resposta dose-dependente; *Zea mays* (L.); FBN.

ABSTRACT

Maize inoculation with bacteria of the genus *Azospirillum* has been studied as a strategy to enhance plant efficiency and optimize nitrogen (N) use. This study aimed to evaluate the agronomic performance of the *Azospirillum brasilense* strain TMA020, as well as to investigate the effects of inoculation method (seed treatment, in-furrow, and in-furrow + foliar) and inoculant dose on biometric parameters, yield components, grain yield, and N concentration in maize plants and grains grown under second-season conditions. The experiment was conducted in a randomized complete block design with an incomplete factorial structure and reduced nitrogen fertilization, including inoculated treatments as well as controls with the commercial strain AbV5/AbV6 and a non-inoculated control. Statistical analyses were performed using mean comparison tests, regression analysis, and planned contrasts, adopting a significance level of 10%. The comparison between strains at the recommended inoculant dose did not reveal significant differences for the evaluated variables. However, dose-response analysis within the TMA020 strain showed that grain yield was dependent on inoculant rate, with improved performance at higher doses. The dose of 200 mL ha⁻¹ resulted in higher grain yield and biomass-related variables compared to 150 mL ha⁻¹. The inoculation method did not significantly affect the evaluated variables. It can be concluded that the agronomic potential of the TMA020 strain is associated with the applied dose, with evidence of a response reflected in grain yield. The results indicate that inoculation may enhance crop efficiency without proportionally altering structural growth or total N accumulation, reinforcing the role of *Azospirillum* as a metabolic modulator in plants

Keywords: Nitrogen use efficiency; Plant growth-promoting bacteria; Agricultural bioinputs; Dose-response relationship; *Zea mays* (L.); Biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação pluvial observadas durante o período experimental (mar–set/2025) em comparação com as médias históricas.....	25
Figura 2. Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes de <i>A. brasilense</i> ao longo do tempo de crescimento.	37
Figura 3. Regressão quadrática da produtividade em função da dose do inoculante a base da estirpe TMA020 de <i>A. brasilense</i> inoculada na semente associada a 50% da adubação nitrogenada.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo das glebas E10 e C08	26
Tabela 2. Curva de calibração para determinação de concentração de amônio.	28
Tabela 3. Descrição dos tratamentos experimentais.	30
Tabela 4. Manejo fitossanitário e nutricional do milho.	33
Tabela 5. Efeito da inoculação da nova estirpe TMA020 de <i>Azospirillum brasilense</i> via semente, na dose recomendada (100 mL ha ⁻¹) para a estirpe comercial (AbV5 + AbV6), associada a 50% da adubação nitrogenada, sobre parâmetros biométricos e produtivos.	41
Tabela 6. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no diâmetro de colmo (mm).	46
Tabela 7. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no comprimento de espiga (cm).	47
Tabela 8. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa fresca de parte aérea da planta (g).	47
Tabela 9. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa fresca de raízes (g).	48
Tabela 10. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa seca de parte aérea (g).	48
Tabela 11. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa seca de raízes (g).	48
Tabela 12. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na produtividade do milho (t ha ⁻¹).	49
Tabela 13. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no peso de mil grãos (g).	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 HIPÓTESE.....	14
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1 A CULTURA DO MILHO.....	15
4.2 NITROGÊNIO.....	16
4.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	19
4.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	20
4.3.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	21
4.3.2 Métodos de Inoculação.....	23
5 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.2 CARACTERÍSTICAS DO CLIMA E DO SOLO	25
5.2.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas	26
5.3 INOCULANTES	26
5.3.1 Caracterização bioquímica da nova estirpe TMA020	27
5.3.2 Controle de viabilidade dos inoculantes	29
5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
5.5 SEMEADURA E INOCULAÇÃO DAS SEMENTES	31
5.6 ADUBAÇÃO E MANEJO	32
5.7 AVALIAÇÕES.....	33
5.7.1 Avaliação biométricas das plantas no estágio vegetativo	33
5.7.2 Determinação do teor de N foliar e nos grãos.....	34
5.7.3 Avaliação dos componentes da produção e produtividade	34
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

6.1 DESEMPENHO AGRONÔMICO DAS ESTIRPES AbV5/V6 E TMA020.....	37
6.2 RESPOSTA DA CULTURA ÀS DOSES DE TMA020.....	42
6.3 EFEITO COMBINADO DE MÉTODO E DOSE DE INOCULAÇÃO NA CULTURA .	45
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da agricultura sob premissas de sustentabilidade, aliado à crescente demanda por alimentos e matéria-prima para a produção industrial, torna-se um desafio central diante da expansão populacional, estimada em 9,9 bilhões de pessoas até 2054 (Nações Unidas, 2024). Nesse cenário, a exigência por maior produtividade e rentabilidade por área intensifica-se, ao mesmo tempo em que se ampliam as demandas por práticas ambientalmente responsáveis, especialmente no manejo de recursos amplamente explorados pela agricultura, como o solo e a água (Tilman *et al.*, 2011; Hungria; Nogueira; Araújo, 2013).

Historicamente, mudanças nos sistemas de manejo foram fundamentais para mitigar impactos ambientais, como ocorreu com a consolidação do sistema de plantio direto, que representou um avanço frente aos riscos de degradação associados ao preparo convencional do solo (Calegari, 2004). De forma semelhante, o uso de insumos agrícolas como pesticidas e fertilizantes, embora essenciais para a produtividade, pode representar riscos ambientais quando recomendados ou manejados inadequadamente. Essa realidade reforça a necessidade de alternativas sustentáveis que possibilitem a substituição total ou parcial desses insumos (Sadiq *et al.*, 2025).

Nesse contexto, os produtos biológicos têm ganhado destaque como biofertilizantes, bioestimulantes e biopesticidas. Esses insumos são considerados alternativas promissoras aos produtos químicos convencionais, pois conciliam eficiência produtiva com sustentabilidade ambiental, contribuindo para sistemas agrícolas mais resilientes e equilibrados (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Hungria *et al.*, 2022).

O uso de inoculantes a base de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) passou a ser uma opção viável atendendo a todos os requisitos, ambientais e econômicos, para sua utilização. Alavancado pelo sucesso da simbiose com leguminosas, principalmente entre a cultura da soja e a bactéria *Bradyrhizobium* sp., que passou a suprir totalmente a necessidade de N pela cultura, novos estudos vêm sendo realizados com outros gêneros de bactérias e diversas famílias de plantas (Hungria; Mendes, 2015).

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. em gramíneas de interesse econômico tem demonstrado resultados positivos quanto à eficiência do uso do N e à possibilidade de substituição parcial da adubação nitrogenada. Em milho, a inoculação com *A. brasilense* tem sido associada à redução parcial de doses de N mineral sem redução significativa de produtividade (Hungria *et al.*, 2022). Resultados semelhantes são observados em trigo, onde a inoculação contribui para maior eficiência agrônômica do N e incremento de desempenho

produtivo (Galindo *et al.*, 2022). Na cultura da cana-de-açúcar, a aplicação de *Azospirillum* também tem apresentado respostas positivas em produtividade e composição nutricional das plantas, reforçando o potencial dos inoculantes como ferramenta para alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Scudeletti *et al.*, 2023).

Estudos recentes têm buscado otimizar os benefícios agrônômicos de bactérias do gênero *Azospirillum* por meio da seleção e modificação de estirpes com características fisiológicas superiores. Um exemplo é a estirpe HM053 de *Azospirillum brasilense*, uma mutante espontânea com capacidade de excretar amônio e fixar N de forma constitutiva, que apresentou incrementos expressivos de produtividade em milho sob condições de campo, mesmo com redução da adubação nitrogenada mineral (Pedrosa *et al.*, 2019). Paralelamente, avanços em engenharia genética, incluindo o uso de ferramentas como CRISPR, têm ampliado o potencial de modificação dirigida de microrganismos promotores de crescimento vegetal, visando maximizar a eficiência da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e o desempenho agrícola em sistemas sustentáveis.

Destaca-se como objeto do presente estudo a estirpe TMA020 de *Azospirillum brasilense*, que apresenta potencial de excreção de amônio, característica associada à fixação biológica de nitrogênio aliado à atuação por múltiplos mecanismos de promoção de crescimento semelhante a estirpe descrita na literatura HM053 (Pedrosa *et al.*, 2019). Tais atributos indicam potencial para aumento da eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas, justificando sua avaliação em comparação com estirpes comerciais.

Porém, é consenso que, por se tratar de produtos biológicos (microrganismos vivos), fatores externos agem diretamente sobre a resposta destes produtos. Formas de aplicação, condições climáticas, temperatura, tipos de solo; todos podem influenciar positiva ou negativamente sobre a ação do produto.

Nesse contexto, a literatura científica tem acumulado evidências provenientes de experimentos conduzidos em laboratório, casa de vegetação e campo, envolvendo múltiplas culturas, solos e estratégias de manejo, fundamentais para validar o desempenho agrônômico de bioinsumos e consolidar bases técnicas que permitam sua recomendação segura e eficiente em sistemas produtivos, reforçando que a continuidade das pesquisas é essencial para o aprimoramento dessas tecnologias e para a obtenção de resultados cada vez mais consistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência agronômica da estirpe excretora de amônio, *Azospirillum brasilense* TMA020, inoculada por diferentes métodos no milho cultivado a campo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, através de parâmetros biométricos, os efeitos de promoção de crescimento em plantas de milho inoculadas com a estirpe de *Azospirillum brasilense* TMA020.

Comparar diferentes métodos de aplicação do inoculante (via semente, via sulco ou via sulco+foliar), a fim de identificar o método mais eficiente para a estirpe de *Azospirillum brasilense* TMA020.

Avaliar os efeitos da inoculação sobre a concentração de N nas plantas e nos grãos de milho.

Determinar a dose do inoculante contendo a estirpe em estudo que apresente melhor desempenho agronômico.

3 HIPÓTESE

A inoculação de milho com a estirpe *A. brasilense* TMA020, excretora de amônio, promove crescimento vegetal e incremento produtivo, sendo a magnitude da resposta dependente da dose e do método de inoculação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) exerce papel fundamental na produção agrícola, constituindo uma das principais commodities do setor de grãos e uma matéria-prima essencial dentro da cadeia produtiva nacional, uma vez que a cultura se destaca por atuar como “ponte” entre agricultura e pecuária, onde uma parcela expressiva do grão é destinada à formulação de rações e à produção de proteína animal, e outra parcela serve como base para múltiplos derivados (amidos, xaropes, óleos e insumos industriais). Também, uma porcentagem significativa da produção vem sendo empregado na produção de biocombustíveis como o etanol de milho (FAO, 2023).

A produção de milho no Brasil é dinâmica, dividida em dois ciclos de cultivo ao longo do ano (Embrapa, 2018). De acordo com o 4º Levantamento da Safra 2025/26 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção total de milho no Brasil, considerando os dois ciclos de cultivo, está estimada em cerca de 138,9 milhões de toneladas, sendo a segunda safra responsável pela maior parcela do volume total - 80% da produção nacional agregada - estimada em cerca de 110,4 milhões de toneladas, enquanto a primeira safra é estimada em aproximadamente 25,9 milhões de toneladas (CONAB, 2026).

O Paraná destaca-se como um dos principais estados produtores de milho do país, tanto em volume quanto em índices de produtividade. Segundo estimativas e levantamentos para a safra 2024/25, as médias estaduais apresentaram crescimento expressivo da produção de milho, com volumes que superam 20 milhões de toneladas, impulsionados pela ampla adoção da segunda safra em sucessão à soja e pelas condições favoráveis em muitas regiões produtivas do estado. Dados de acompanhamento da safra indicam que o estado acompanha o panorama nacional de produção, sendo a segunda safra responsável pela maior parte do volume estadual (CONAB, 2025). Estes resultados, alinhados ao crescimento da área plantada e ao uso de tecnologias de manejo e melhoramento genético, consolidam o papel do Paraná não apenas como um dos maiores produtores brasileiros de milho, mas também como um importante polo de inovação e eficiência produtiva no setor de grãos.

Em escala global, devido a sua ampla variação genotípica e plasticidade fenotípica do milho, ao longo de aproximadamente 8000 anos desde os primeiros registros de cultivo da espécie, permitiram o cultivo em regiões de climas subtropicais, temperados e tropicais (Kaneko *et al.*, 2016). A espécie *Zea mays* L. pertence à família Poaceae e apresenta metabolismo fotossintético característico do tipo C4. Tal mecanismo confere alta eficiência no

aproveitamento da radiação solar e do carbono atmosférico, resultando em elevado potencial de produção de biomassa, especialmente em ambientes com alta luminosidade e temperaturas elevadas (Magalhães *et al.*, 2002, Taiz *et al.*; 2017).

Dentre as características morfológicas da cultura pode-se destacar o colmo ereto, sem ramificações, folhas lanceoladas dispostas alternadamente, de cor verde claro a verde escuro e pilosas, além do sistema radicular fasciculado. Outra característica da planta é a presença de raízes adventícias formadas a partir de nós inferiores do colmo, para auxiliar na sustentação da planta. Possui parte masculina e feminina em inflorescências distintas na mesma planta (planta monóica), sendo a parte masculina conhecida como panícula presente na parte superior da planta, e a parte feminina na região axilar das folhas responsável pela origem da espiga que se polinizada adequadamente, servirá de eixo para produção dos grãos conhecidos por cariopse (Paterniani; Campos, 1999; Taiz *et al.*, 2017).

O sistema radicular fasciculado, apesar de explorar uma porção ampla do solo devido a ausência de impedimentos físicos e boa estrutura do solo; apresenta sensibilidade a compactação, baixa aeração e limitações químicas (acidez, alumínio tóxico, baixa disponibilidade de nutrientes) podendo restringir a absorção e reduzir o potencial produtivo, especialmente em sistemas intensificados (Fancelli; Dourado Neto, 2000). Outro fator limitante para a cultura está relacionado à elevada exigência nutricional, com destaque para o N, nutriente diretamente associado à expansão foliar, ao acúmulo de biomassa, à fotossíntese e, por consequência, ao rendimento de grãos (Hirel *et al.*, 2007). Diante da centralidade do N na produtividade do milho, torna-se fundamental compreender de forma mais aprofundada sua dinâmica no sistema solo-planta, aspecto que será discutido no tópico a seguir.

4.2 NITROGÊNIO

Dentre os nutrientes fornecidos via adubação, o N foi o primeiro a ter sua essencialidade estabelecida (Malavolta, 1980). O N é responsável pelo crescimento das plantas, presente nas regiões meristemáticas de renovação de células e tecidos, sendo utilizado também na síntese de proteínas e na formação de clorofila garantindo a manutenção deste pigmento que interfere diretamente na fotossíntese da planta. É responsável também pela formação das sementes quando é translocado de órgãos mais velhos para os drenos de maior demanda (Hungria; Mendes, 2015; Taiz; Zeiger, 2009).

O suprimento adequado de N favorece crescimento vegetativo vigoroso, grande área foliar, alta taxa fotossintética e boa formação/enchimento de grãos. Para a cultura do milho,

estima-se que a exigência de nitrogênio seja da ordem de 15 a 25 kg por tonelada de grãos produzida, dos quais cerca de 60% são exportados na colheita e o restante permanece na área na forma de resíduos culturais. Esses valores evidenciam a elevada demanda da cultura por nitrogênio e reforçam a importância de estratégias que aumentem a eficiência do uso desse nutriente (Ciampitti, Vyn, 2014).

O excesso ou a falta de N ao longo do ciclo da cultura podem ser visualmente identificados. Longos períodos vegetativos e baixa produção são sinais de excesso do nutriente. Crescimento lento indica claramente a deficiência de N, somado a fatores como coloração verde-amarelada, desenvolvimento diminuto de ramos e baixo desenvolvimento de flores, reduzido número de sementes com baixo rendimento, resultando em perdas de produtividades significativas (Taiz, Zeiger, 2004).

O N presente no solo agrícola é proveniente de múltiplas origens, resultantes tanto de processos naturais quanto de intervenções antrópicas. Em condições naturais, a principal fonte de N disponível às plantas é a mineralização da matéria orgânica do solo, processo mediado pela atividade microbiana, no qual o N orgânico é convertido em formas inorgânicas assimiláveis, especialmente amônio (NH_4^+), que pode posteriormente ser oxidado a nitrato (NO_3^-) (Robertson; Vitousek, 2009). Além disso, o solo recebe N por meio da FBN, realizada por microrganismos diazotróficos de vida livre, associativos ou simbióticos, que convertem o N_2 atmosférico em amônia, contribuindo de forma variável para o suprimento do nutriente, a depender do sistema de cultivo e da presença de hospedeiros adequados (Kuypers *et al.*, 2018).

O N fixado na forma de amônia (NH_3) ou óxidos de N (NO_x), produzidos por métodos abióticos naturais e antropogênicos, também contribui para reservatórios ambientais de N (Zhang; Ward; Sigman, 2020). No contexto do aporte antrópico, destacam-se a aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais, como ureia, nitrato e sulfato de amônia, a incorporação de resíduos culturais, o uso de adubos orgânicos, como esterco, compostos e dejetos animais, bem como a introdução de culturas leguminosas em rotação ou consórcio, que incrementam o N do solo via FBN e reciclagem de resíduos. A contribuição relativa de cada uma dessas fontes é altamente dependente do manejo adotado, das condições edafoclimáticas e da intensidade de uso do solo, determinando a disponibilidade de N às plantas e a eficiência de uso do nutriente nos sistemas agrícolas (Robertson; Vitousek, 2009).

Os fertilizantes minerais representam a principal fonte de N nos sistemas agrícolas, destacando-se a ureia, o nitrato e o sulfato de amônio, bem como formulações nitrogenadas mistas. Entretanto a sua produção é um processo altamente oneroso, pois está diretamente relacionado com a utilização de combustíveis fósseis (Erisman *et al.*, 2008).

A eficiência de uso do N proveniente dos fertilizantes é geralmente baixa,

frequentemente inferior a 50%, em função da elevada reatividade do nutriente no solo e de sua suscetibilidade a diferentes vias de perda (Cassman *et al.*, 2002). As principais rotas de dissipação incluem a volatilização de amônia, especialmente associada à aplicação superficial de ureia, a lixiviação de nitrato, favorecida por sua alta mobilidade no perfil do solo, e a desnitrificação, processo microbiano intensificado sob condições de baixa aeração, que resulta na emissão de N_2O e N_2 (Galloway *et al.*, 2008).

Essas perdas comprometem diretamente a eficiência agronômica dos fertilizantes nitrogenados, elevando os custos de produção e reduzindo o retorno econômico ao produtor. Paralelamente, acarretam impactos ambientais significativos, como a contaminação de águas subterrâneas por nitrato, a eutrofização de corpos hídricos e o aumento das emissões de gases de efeito estufa, especialmente o óxido nitroso (N_2O).

Em sistemas de alta produtividade do milho, a distribuição e disponibilidade do N fixado em todo o ciclo de cultivo é um dos principais determinantes do desempenho das plantas, paralelamente, atendendo as premissas de sustentabilidade, pois a aplicação excessiva ocasiona perdas por volatilização, lixiviação e desnitrificação reduzem a capacidade de aproveitamento do nutriente pela planta e aumentam impactos ambientais (Galloway *et al.*, 2008).

Desta forma, linhas de pesquisa atuais buscam no melhoramento genético e no manejo dos sistemas produtivos, aumentar a eficiência de conversão de N em rendimento. Um estudo publicado por Ordóñez *et al.* (2025) discutiu como híbridos modernos e estratégias de melhoramento contribuíram para ganhos de eficiência no uso de N ao longo de décadas, indicando que progresso genético e ajustes de manejo caminham de forma integrada para sustentar produtividade com maior eficiência.

Também, do ponto de vista de manejo, estratégias como o parcelamento da adubação nitrogenada são frequentemente investigadas, buscando sincronizar a oferta de N com demanda da cultura e reduzir perdas. Evidências recentes indicam que o parcelamento pode melhorar crescimento radicular, absorção e utilização do N e respostas de produtividade sob determinados cenários ambientais (incluindo condições de aquecimento do solo), reforçando a importância de ajustar época e forma de aplicação ao ambiente e ao sistema (Xia *et al.*, 2025; Zhao *et al.*, 2025).

A dependência excessiva de fertilizantes nitrogenados sintéticos evidencia a necessidade de estratégias complementares e mais sustentáveis para o suprimento de N às culturas, abrindo espaço para a adoção de práticas como a FBN (Sutton *et al.*, 2011; Lassaletta *et al.*, 2014). Nesse contexto, o N oriundo da FBN destaca-se por apresentar um caráter naturalmente regulado, uma vez que promove a conversão do N atmosférico (N_2) em formas

assimiláveis pelas plantas por meio da atividade microbiana. Esse processo biológico contribui para a redução da dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e, consequentemente, para a mitigação dos impactos negativos associados ao seu uso excessivo (Bomfim *et al.*, 2021).

4.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Aproximadamente 78% da atmosfera terrestre é composta por N_2 ; entretanto, apesar de sua abundância, essa forma gasosa é quimicamente estável e indisponível para assimilação direta pelas plantas. A partir da FBN, o N_2 é convertido em amônia (NH_3), forma assimilável pelas plantas. Esse processo é realizado por bactérias diazotróficas, as quais contem o complexo enzimático nitrogenase, considerado o principal componente bioquímico da FBN. A nitrogenase atua na quebra da ligação tripla altamente estável do N_2 , possibilitando sua conversão em NH_3 por meio de um processo energeticamente dispendioso, dependente de ATP e de elétrons provenientes do metabolismo microbiano. A NH_3 formada é rapidamente incorporada em compostos orgânicos, como aminoácidos, integrando-se ao metabolismo nitrogenado das plantas (Soumare *et al.*, 2020; Bashan; De-Bashan, 2010).

Além de contribuir diretamente para o suprimento de N nos sistemas agrícolas, a FBN exerce efeitos indiretos relevantes sobre a sustentabilidade dos agroecossistemas. O N de origem biológica apresenta dinâmica mais integrada aos processos naturais do solo, favorecendo o incremento do teor de N nos sistemas produtivos e refletindo positivamente na produtividade das culturas. Ademais, a FBN influencia a qualidade do resíduo vegetal depositado no solo, especialmente na forma de palhada, promovendo maior aporte de N orgânico e contribuindo para a melhoria da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica do solo (Peoples *et al.*, 2009; Trivedi *et al.*, 2020).

Os impactos econômicos e ambientais associados à FBN são expressivos. Na safra 2019/2020, considerando-se a área cultivada com soja no Brasil e a elevada exigência de N da cultura, estima-se uma economia de aproximadamente 15,2 bilhões de dólares decorrente da substituição de fertilizantes nitrogenados sintéticos pelo N proveniente da FBN. Além do benefício econômico, a inoculação e coinoculação das culturas contribuíram para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa, evitando a emissão de cerca de 183 milhões de Mg de CO_2 equivalente, por meio da assimilação de CO_2 e do sequestro de carbono nos sistemas agrícolas (Telles *et al.*, 2023).

Além de favorecer uma maior eficiência no aproveitamento do N, a FBN integra-se aos processos naturais do solo, promovendo maior sustentabilidade dos sistemas agrícolas. A

incorporação dessa estratégia no manejo nutricional das culturas representa uma alternativa promissora para conciliar elevados níveis de produtividade com a redução de custos e impactos ambientais, especialmente em culturas de alta exigência nitrogenada, como o milho (Ciampitti; Vyn, 2014).

Esses resultados evidenciam o papel estratégico da FBN na construção de sistemas agrícolas mais eficientes e sustentáveis, reforçando a importância do contínuo investimento em pesquisa, desenvolvimento e difusão de tecnologias relacionadas à inoculação e ao manejo biológico do N. A ampliação do conhecimento técnico e a divulgação dos resultados científicos são fundamentais para estimular a adoção dessas práticas pelos produtores, especialmente em culturas de elevada demanda nitrogenada, consolidando a FBN como componente central de estratégias modernas de manejo da fertilidade do solo.

Embora a FBN represente um dos mecanismos mais estudados na interação entre microrganismos e gramíneas, ela não constitui a única via pela qual bactérias promotoras de crescimento vegetal atuam. O efeito positivo dessas bactérias resulta, na maioria das vezes, da ação combinada de múltiplos mecanismos fisiológicos e bioquímicos, incluindo produção de fitohormônios, solubilização de nutrientes, modulação do estresse vegetal e interação com a microbiota do solo, fenômeno descrito como hipótese aditiva do crescimento vegetal promovido por microrganismos (Bashan; De-Bashan, 2010; Cassán; Diaz-Zorita, 2016). Nesse sentido, compreender o conjunto de processos envolvidos amplia a visão sobre o papel das bactérias promotoras de crescimento vegetal em sistemas agrícolas.

4.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

A aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem se consolidado como estratégia eficaz na agricultura para o aumento da produtividade, redução de custos e mitigação de impactos ambientais, contribuindo para sistemas agrícolas mais sustentáveis. As BPCV são utilizadas como inoculantes agrícolas, definidos como produtos contendo microrganismos vivos aplicados em sementes, plantas ou solo com o objetivo de promover o crescimento vegetal e otimizar processos biológicos, como a FBN e a solubilização de nutrientes (MAPA, 2011). A literatura recente descreve uma ampla diversidade de gêneros bacterianos com potencial de promoção de crescimento vegetal, sendo frequentemente relatados *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Serratia* e *Arthrobacter*, entre outros (Kumar; Pareek, 2022; Cassán; Diaz-Zorita, 2016; Backer *et al.*, 2018).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal têm capacidade de atuar como: biofertilizantes, disponibilizando macro e micronutrientes do solo facilitando sua absorção pelas plantas; fitoestimuladores promovendo maior desenvolvimento de parte aérea e raiz através da produção de fitohormônios; bioremediadores quelando metais pesados e outras moléculas oriundas de poluentes e como biopesticidas, evitando ou ativando mecanismos de defesa da planta contra patógenos. Todas essas atividades das BPCV tornam a planta resistente ou capaz de suportar fatores adversos (Bomfim *et al.*, 2021).

Um dos casos de maior sucesso da interação planta-bactéria envolve a soja e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium spp.*, uma vez que a bactéria supre totalmente a necessidade de N pela cultura (Hungria; Mendes, 2015). Atualmente no Brasil cerca de 85% da área cultivada com soja utiliza *Bradyrhizobium spp.* Espécies bacterianas do gênero *Azospirillum*, também têm sido amplamente estudadas desde sua redescoberta por J. Döbereiner e colaboradores na década de 1970 (Döbereiner; Day, 1975); devido a sua capacidade de colonizar centenas de espécies de plantas e melhorar seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (Cassán; Diaz-Zorita, 2016).

4.3.1 Gênero *Azospirillum*

De acordo com a definição clássica proposta por Döbereiner, bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos diazotróficos de vida livre que estabelecem associações íntimas com gramíneas por meio da colonização da rizosfera e de tecidos internos das raízes, promovendo FBN de forma associativa, sem a formação de nódulos (Döbereiner; Pedrosa, 1987).

O gênero *Azospirillum* compreende diversas espécies associadas a gramíneas e outras plantas de interesse agrônomo, incluindo *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. oryzae* e *A. amazonense*, entre outras. Entre elas, *Azospirillum brasilense* destaca-se como a espécie de maior relevância agrônoma, concentrando a maioria dos estudos sobre promoção de crescimento vegetal e desenvolvimento de inoculantes comerciais. Estirpes como Ab-V5/Ab-V6, amplamente utilizadas no Brasil, e Az39, adotada na Argentina, são exemplos de aplicações consolidadas que demonstram o potencial do gênero na agricultura moderna (Cassán; Diaz-Zorita, 2016). Os primeiros estudos tinham por objetivo observar e aproveitar o potencial de FBN em gramíneas, para suprir total ou parcialmente a necessidade de N. Porém, são inúmeros os mecanismos pelos quais essas bactérias promovem o crescimento das plantas hospedeiras (Bonfim *et al.*, 2021).

A inoculação das sementes com bactérias do gênero *Azospirillum* pode promover diversas alterações nas culturas, entre elas: o fornecimento de reguladores de crescimento como auxinas, giberilinas e citocininas (Cassán *et al.*, 2009), a mitigação de stress e o controle biológico de patógenos (Bashan; De-Bashan, 2010), bem como o crescimento radicular (Volfson *et al.*, 2013). Do ponto de vista nutricional, tais bactérias podem proporcionar benefícios além da FBN, como a solubilização de fosfatos e o aumento da absorção de NH_4^+ e NO_3^- (Hungria *et al.*, 2010), contribuindo, dessa forma, para o aumento da eficiência da adubação.

Diversos trabalhos com gramíneas de interesse econômico como milho, trigo, cana-de-açúcar e até forrageiras voltadas para produção animal indicam que a utilização de inoculantes a base de *Azospirillum spp.* promovem o crescimento da planta, possivelmente por múltiplos fatores, com destaque a sua habilidade de produzir fitohormônios e fixar N (Bashan; De-Bashan, 2010; Cassán *et al.*, 2014; Hungria *et al.*, 2010). No milho, a inoculação de *Azospirillum spp.* pode suprir parcialmente, mesmo que em quantidades variáveis, dependendo de diversos fatores ambientais e climáticos, a utilização de N, bem como estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas através de diversos mecanismos, o que já reflete na redução do custo de produção e garante rentabilidade também em incrementos de produtividade, qualidade de matéria orgânica depositada no solo além de atender as premissas de uma agricultura sustentável (Hungria *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*; 2017). Em milho, a partir de dados de metanálise que avaliou 103 ensaios a campo, a inoculação de *Azospirillum spp.* promoveu significativamente crescimento radicular das plantas inoculadas, que refletiu em crescimento de parte aérea, produtividades e parâmetros qualitativos como teor de N no grão (Barbosa *et al.*, 2022).

Diferentemente das estirpes comerciais tradicionalmente utilizadas em inoculantes, a estirpe HM053 de *Azospirillum brasilense* apresenta uma característica fisiológica singular relacionada à excreção constitutiva de amônio. Essa linhagem é uma mutante espontânea com baixa atividade de glutamina sintetase, o que limita a assimilação intracelular do N fixado e resulta na liberação de amônio no ambiente radicular. Em condições de campo, essa característica se refletiu em incrementos de produtividade superiores aos observados com a estirpe comercial AbV5, alcançando aumentos de até 29% na produção de grãos e desempenho equivalente a doses elevadas de fertilização nitrogenada mineral. Tais resultados obtidos por Pedrosa *et al.* (2019) indicam que a HM053 representa uma alternativa promissora para intensificar a eficiência da FBN e reduzir a dependência de fertilizantes sintéticos.

A performance superior da estirpe HM053 demonstra que alterações direcionadas no

metabolismo de *Azospirillum* podem resultar em ganhos agrônômicos expressivos. Nesse sentido, avanços recentes em engenharia genética, especialmente por meio de ferramentas de edição genômica como CRISPR, abrem perspectivas para o desenvolvimento de linhagens com características metabólicas otimizadas, capazes de ampliar ainda mais os benefícios da associação planta-bactéria (Argente-Martínez *et al.*; 2024). A modificação dirigida de vias relacionadas à FBN, síntese de fitohormônios e tolerância a estresses ambientais representa uma estratégia promissora para potencializar o uso de inoculantes microbianos em sistemas agrícolas sustentáveis.

4.3.2 Métodos de Inoculação

No Brasil, os inoculantes são regulamentados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) devendo atender critérios de qualidade, concentração celular e segurança estabelecidos em normativas específicas. A eficiência desses produtos depende não apenas da qualidade microbiológica da formulação, mas também da forma de aplicação no sistema produtivo, podendo ocorrer via tratamento de sementes, aplicação no sulco de semeadura ou pulverização foliar, estratégias que influenciam a colonização bacteriana e a interação com a planta.

A aplicação dos inoculantes no solo visa facilitar o contato das BPCV com a região rizosférica e a raiz das plantas. Pela facilidade de aplicação a inoculação via semente é mais empregada. A inoculação via semente favorece o contato do inoculante desde o início do processo de germinação da semente, porém, com o uso das tecnologias de tratamento de sementes certos questionamentos relacionados a compatibilidade e sobrevivência das BPCVs têm sido levantados, sendo esta uma desvantagem para este método de inoculação (Takahashi *et al.*, 2022).

Em contrapartida a inoculação via sulco (via solo) evita o contato direto do inoculante a semente tratada, mas necessita de investimento para que a aplicação seja realizada corretamente. Existem ainda formas de inoculação pouco conhecidas, como a aplicação foliar de inoculantes, incorporação no substrato, aplicação sobre o solo, entre outros (Fukami *et al.*, 2016).

Takahashi *et al.*, (2024) demonstraram que o método de inoculação altera o comportamento das estirpes de *Azospirillum* e determina a eficiência da promoção de crescimento em milho, onde o desempenho agrônômico das estirpes de *Azospirillum* AbV5 e Az39 apresentaram maior promoção de crescimento quando aplicadas via inoculação no solo,

enquanto a estirpe HM053 respondeu de forma superior à inoculação via semente; adicionalmente, Az39 destacou-se por apresentar colonização sistêmica da planta, evidenciando comportamento ecológico distinto entre estirpes. Experimentos a campo realizados em todo Brasil, quando avaliados em metanálise apontaram maiores efeitos da inoculação com aplicação de inoculante turfoso via semente, seguido pelo inoculante líquido via semente (Barbosa *et al.*, 2022).

Desta forma buscando otimizar o potencial de promoção de crescimento de diferentes estirpes do gênero *Azospirillum*, métodos de aplicação necessitam serem estudados sob diferentes condições.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Campo Demonstrativo Experimental (CDE) da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON) – UEPG, localizado no município de Ponta Grossa/PR, coordenadas: latitude de 25°05'31"S e longitude 50°03'52"W com altitude média de 1002 metros.

5.2 CARACTERÍSTICAS DO CLIMA E DO SOLO

De acordo com a classificação climática de Köppen e Geiger (1928), Ponta Grossa/PR possui clima subtropical úmido mesotérmico com verão ameno, temperatura média de aproximadamente 18,3°C e precipitação anual de aproximadamente 1.505 mm. Os dados meteorológicos da área experimental durante a condução e avaliação do experimento é apresentada na Figura 1.

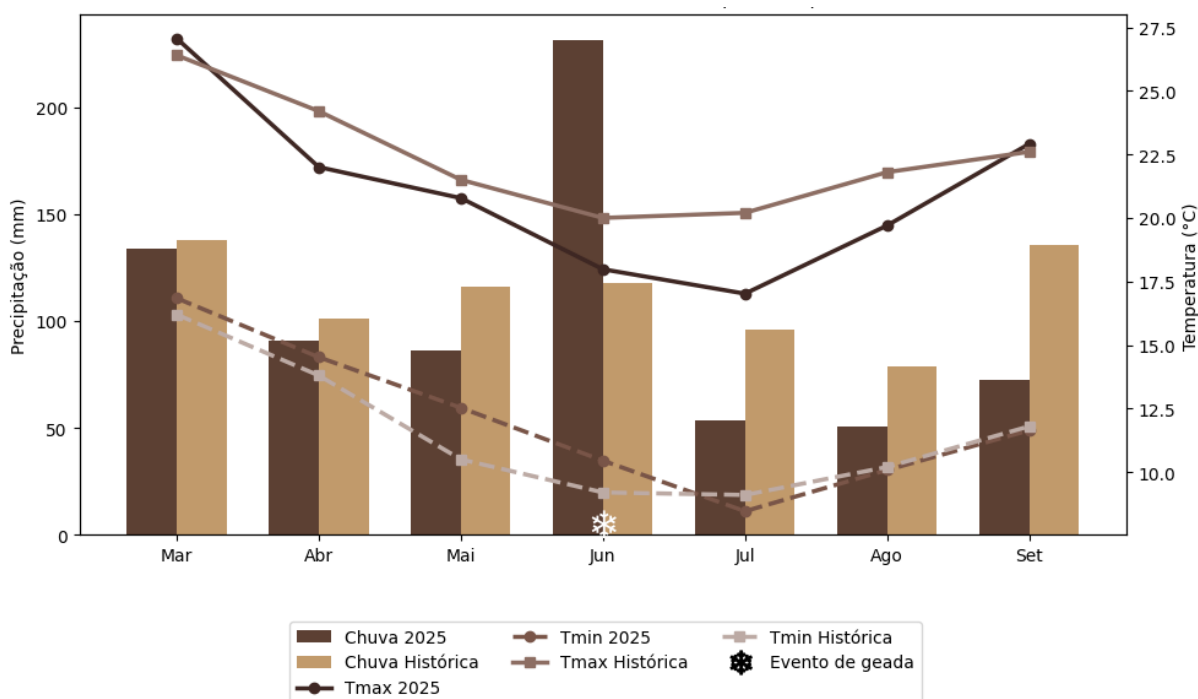


Figura 1. Temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação pluvial observadas durante o período experimental (mar–set/2025) em comparação com as médias históricas. Barras correspondem à precipitação mensal acumulada (mm) e linhas às temperaturas médias máximas e mínimas (°C). O símbolo * indica a ocorrência de geada durante o experimento. **Fonte:** o autor

O solo das glebas experimentais, anteriormente cultivadas com trigo e submetidas a um período de pousio anteriormente a semeadura do milho, foi amostrado em pontos aleatórios totalizando dez subamostras em cada gleba experimental, na profundidade de 0 a 0,20 m para análise e caracterização química e física dos solos das duas glebas experimentais foram realizadas através da análise de material, proveniente de amostras compostas. Os resultados são apresentados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo coletado na camada de 0,0-0,2 m proveniente das glebas E10 e C08 do CDE da Fazenda Escola Capão da Onça - UEPPG, localizada no município de Ponta Grossa/PR, 2025

Características químicas											
	pH	V	P	MO	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC
	CaCl ₂	- % -	mg dm ⁻³	g dm ⁻³	----- cmol _c dm ⁻³ -----						
E10	5,75	76,43	35,70	39,01	5,36	4,06	0,75	0,00	3,13	10,17	13,31
C08	4,71	43,24	36,80	40,31	3,36	1,24	0,63	0,27	7,25	5,53	12,78
Características granulométricas											
	Argila				Silte				Areia		
	----- g Kg ⁻¹ -----										
E10	216				50,5				733,5		
C08	338				79,5				582,5		

Legenda: (P) Extrator Mehlich-1; (Al, Ca, Mg, K) NH₄Cl; (H+Al) pH SMP (7,5); (pH) Extrator CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹. Análise realizada no Laboratório Interpartner Ltda, Ponta Grossa-PR.

5.2.1 Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas

Novas amostras de solo foram coletadas para realizar a contagem de microrganismos diazotróficos para determinação da população de bactérias em n° de células por grama de solo, através da estimativa do NMP usando a tabela de MacCrady em meio semi-sólido NFB, de acordo com metodologia descrita por Döbereiner *et al.* (1995).

Com base nos resultados da contagem de microrganismos diazotróficos nos solos das glebas experimentais, estes apresentavam população de 55,07 e 10,44 UFC/g⁻¹ de solo seco, nas glebas C08 e E10, respectivamente.

5.3 INOCULANTES:

Os inoculantes utilizados foram adquiridos de empresas especializadas em produção e comercialização de produtos biológicos, a fim de fornecer as mesmas condições para ambas as cepas bacterianas utilizadas.

Segundo a empresa Agrocete Indústria de Fertilizantes LTDA, o inoculante utilizado como controle padrão a base da bactéria *Azospirillum brasilense*, Cepa AbV5/AbV6 apresentava as seguintes características: produto líquido para milho, com concentração comercial de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL, com dosagem recomendada de 100 mL para 60.000 sementes. Lote: 005206; Fabricação: 31/01/2025 e validade: 31/10/2026.

O inoculante portador da bactéria *Azospirillum brasilense*, cepa TMA020, foi produzido no laboratório da empresa Bioma Indústria Comércio e Distribuição Ltda. O inoculante, também líquido, foi produzido quantidade suficiente para atender a demanda do experimento, com concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

A estirpe TMA020 foi obtida a partir da estirpe parental FP2 (AbV5) pelo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR. O(s) gene(s) alvo(s) da edição gênica permanece confidencial; entretanto, a modificação teve como objetivo induzir a a estirpe à fixação de N de maneira constitutiva e à excreção do amônio sintetizado.

5.3.1 Caracterização bioquímica da nova estirpe TMA020:

Excreção de amônio

As estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e TMA020, foram crescidas em 3 mL de meio NFbHPN lactato semissólido (Machado *et al.*, 1991), isento de amônia, suplementado com estreptomicina (80 ug mL^{-1}), ácido nalidíxico (10 ug mL^{-1}) e 0,5 mM de glutamato. A concentração final de glutamato foi obtida pela adição de 1,5 μL de solução estoque 1 M por 3 mL de meio. De forma análoga, a estirpe TMA020 foi inoculada com 10 μL do pré-inóculo, depositados no centro da coluna do meio após sua solidificação.

As culturas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Após esse período inicial, a produção de amônia foi avaliada nos tempos de 48, 72, 96 e 120 h de crescimento. Em cada ponto de coleta, foram retirados 100 μL do meio semissólido aproximadamente 3 mm abaixo da película bacteriana formada na superfície. A quantificação da amônia foi realizada por método colorimétrico baseado na reação do salicilato, conforme descrito por Verdouw *et al.* (1978), onde, cada amostra de 100 μL do material coletado foram diluídos em 900 μL de água destilada autoclavada, seguidos da adição de 500 μL da solução de salicilato/nitroprussiato de sódio/NaOH e 200 μL da solução de dicloroisocianurato. As amostras permaneceram em repouso por 1 h, em temperatura ambiente e protegidas da luz. A absorbância foi medida a 690 nm em espectrofotômetro.

A concentração de amônio foi determinada por curva de calibração construída com

cloreto de amônio (Tabela 2). A solução padrão foi preparada por diluição seriada em água destilada, resultando em concentrações finais entre 0 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os tubos da curva foram preparados com volume final de 1,7 mL e processados com os mesmos reagentes utilizados nas amostras. As concentrações de amônio foram calculadas a partir da curva padrão de cloreto de amônio por regressão linear. Os valores obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição e expressos em $\mu\text{g NH}_4^+ \text{mL}^{-1}$.

Tabela 2. Curva de calibração para determinação de concentração de amônio.

Concentração de $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução contendo 10 $\mu\text{g NH}_4\text{-N}$ mL^{-1} (uL)	Água destilada (uL)
0,00	0	1000
0,50	50	950
1,00	100	900
1,25	125	875
1,50	150	850
1,75	175	825
2,00	200	800

Produção de Acido indol acetico (AIA)

Conforme a metodologia descrita por Araujo *et al.* (2025), as cepas de *Azospirillum* (AbV5/AbV6, TMA020) foram cultivadas a 30 °C com agitação orbital a 120 rpm em meio Nfb lactato suplementado com 50 mM de solução de fosfato e 20 mM de NH_4Cl (NfbHPN) (Pedrosa; Yates 1984) até atingirem a fase de crescimento exponencial, correspondendo a uma DO600 de 1,2. Alíquotas do pré-inóculo (100 μL) foram transferidas para frascos de 50 mL contendo 10 mL de NfbHPN, suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de L-triptofano (Trp) (Ona *et al.* 2005). As bactérias foram incubadas a 30 °C com agitação a 120 rpm por 24, 48 e 72 horas. Em cada ponto de coleta, 500 μL da cultura bacteriana foram coletados e incubados com clorofórmio (10 μL) e SDS (0,003%) por 5 min a 30 °C para permeabilizar as células e liberar o AIA intracelular.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 12.000 xg por 10 min para coletar o sobrenadante, que foi utilizado para quantificar o AIA utilizando a reação colorimétrica de

Salkowski (Gordon; Weber, 1951). Além disso, as concentrações bacterianas foram determinadas pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em microgotas no meio RC (Rodriguez Caceres, 1982).

5.3.2 Controle de viabilidade dos inoculantes:

A concentração de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹) dos inoculantes contendo as estirpes de *A. brasilense* AbV5/AbV6 e TMA020, no dia da inoculação/semeadura, foi determinada por meio da técnica da microgota (Hoben; Somasegaran, 1982). Para isso, uma alíquota de 100 µL do inoculante foi submetida a diluições seriadas decimais (10⁻² a 10⁻¹⁰) em solução salina estéril a 0,85%. De cada diluição, alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em triplicata sobre a superfície de placas de Petri contendo meio de cultura apropriado.

Após a incubação por 24 a 48 horas, período necessário para o desenvolvimento das colônias, realizou-se a contagem das UFCs com auxílio de lupa estereoscópica. Para cada diluição, foi calculada a média das três microgotas. A estimativa da concentração bacteriana foi obtida multiplicando-se a média de UFC pelo fator de diluição correspondente e pelo fator de correção referente ao volume plaqueado. Como cada microgota continha 10 µL (0,01 mL), aplicou-se o fator de correção de 10² para expressar os resultados em UFC mL⁻¹.

A estirpe TMA020 apresentou concentração média de aproximadamente $8,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Já o inoculante comercial AbV5/V6 apresentou concentração estimada de $2,8 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, considerando as diluições dentro da faixa confiável de contagem.

5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram utilizadas duas áreas, contendo dois blocos em cada área, totalizando quatro blocos, cada bloco composto por doze tratamentos, totalizando 48 parcelas experimentais.

Cada parcela experimental foi constituída de 9 linhas de 0,45 m de espaçamento, com 7 m de comprimento e 4,05 m de largura, totalizando área de 28,35 m² por parcela, e área total de 604,80 m². Para obtenção da área útil das parcelas foram desconsideradas as linhas laterais externas e 1,0 m das extremidades das linhas de cada parcela.

Os tratamentos foram constituídos por um conjunto de combinações envolvendo doses e formas de aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal, além de tratamentos

controle. A estrutura dos tratamentos não configurou um fatorial completo, uma vez que nem todas as combinações possíveis entre bactéria, dose e método de inoculação foram avaliadas. As doses do inoculante (50, 100, 150 e 200 mL por 60.000 sementes) foram testadas apenas para a bactéria *A. brasilense* TMA020, com inoculação via semente antes da semeadura. Os tratamentos com o método de inoculação via sulco foram avaliadas apenas com as doses 150 e 200mL por hectare. O método de inoculação sulco + foliar de forma semelhante avaliou apenas as doses 150 e 200 mL por hectare, via sulco, acrescidas da aplicação de 300mL por hectare via foliar durante o crescimento vegetativo do milho, com densidade de semeadura prevista de 60.000 sementes por hectare, correspondente a recomendação utilizada no método de inoculação via semente. A bactéria AbV5/V6 foi utilizada exclusivamente como controle comercial, em dose fixa de 100mL por 60.000 sementes, inoculada via tratamento de semente. Adicionalmente, foram incluídos tratamentos controle sem inoculação e com diferentes níveis de adubação nitrogenada. Dessa forma, o conjunto experimental caracterizou-se como um arranjo fatorial incompleto, analisado considerando os tratamentos de forma individual no modelo estatístico geral (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos tratamentos experimentais.

Tratamentos	Nitrogênio	Estirpe	Forma de aplicação	Dose
T1	0% N	—	—	—
T2	50% N	—	—	—
T3	100% N	—	—	—
T4	50% N	AbV5/AbV6 (padrão)	TS	100 mL / 60.000 sementes
T5	50% N	TMA020	TS	50 mL / 60.000 sementes
T6	50% N	TMA020	TS	100 mL / 60.000 sementes
T7	50% N	TMA020	TS	150 mL / 60.000 sementes
T8	50% N	TMA020	TS	200 mL / 60.000 sementes

T9	50% N	TMA020	Sulco	150 mL / 60.000 sementes
T10	50% N	TMA020	Sulco	200 mL / 60.000 sementes
T11	50% N	TMA020	Sulco + Foliar	150 mL (sulco) + 300 mL ha ⁻¹ (foliar)
T12	50% N	TMA020	Sulco + Foliar	200 mL (sulco) + 300 mL ha ⁻¹ (foliar)

Legenda: Descrição dos tratamentos experimentais envolvendo diferentes níveis de adubação nitrogenada e estratégias de inoculação com *Azospirillum brasilense*. O tratamento controle consistiu na ausência de N e inoculação (T1). Os tratamentos T2 e T3 corresponderam a 50% e 100% da adubação nitrogenada recomendada, respectivamente, sem inoculação. Os demais tratamentos receberam 50% da adubação nitrogenada associada à inoculação com estirpes comerciais (AbV5/AbV6) ou experimental (TMA020), aplicada via tratamento de semente (TS), sulco ou combinação sulco + foliar, em diferentes doses.

5.5 SEMEADURA E INOCULAÇÃO DAS SEMENTES

Para o experimento utilizou-se o milho híbrido Wehrtec VA 16DM PRO4, o qual apresenta as características de híbrido super precoce; alta produtividade, tecnologia PRO4 que confere proteção contra insetos acima e abaixo do solo, potencial de “dry down” garantindo rapidez na maturação fisiológica e secagem, utilizado preferencialmente para produção de grãos.

As sementes utilizadas possuíam tratamento prévio com o inseticida Poncho®, na dose de 70mL para 60000 sementes.

A semeadura das parcelas foi realizada no dia doze de março de dois mil e vinte cinco, com o auxílio de semeadora Metasa, com regulagem realizada anteriormente para de distribuição de 2,7 sementes por metro no sulco de semeadura, tendo alcançado população final aproximada de 60.000 plantas ha⁻¹.

Os tratamentos com inoculação via tratamento de sementes foram conduzidos utilizando inoculantes contendo as estirpes *A. brasilense* AbV5/AbV6 (padrão comercial) e *A. brasilense* TMA020, conforme as doses estabelecidas para cada tratamento. As doses recomendadas de 50, 100, 150 e 200 mL por 60.000 sementes foram proporcionalmente ajustadas para um lote de 1.280 sementes (aproximadamente 400 g), correspondendo respectivamente a 1,07; 2,13; 3,20 e 4,27 mL de inoculante. Os volumes foram mensurados com micropipeta de até 1000 µL e aplicados diretamente sobre as sementes em sacos de plástico de alta densidade. Em seguida os sacos plásticos foram inflados e a massa de sementes agitada por aproximadamente dois minutos para uniformizar a distribuição do inoculante nas sementes. Após secagem as sementes foram mantidas a sombra e a semeadura foi realizada o mais breve possível evitando a redução

do número de unidades formadoras de colônia por semente (Hungria, 2011).

Os tratamentos cujo método de inoculação foi via sulco, foi conduzido da seguinte forma: manteve-se o volume fixo de calda de 50 L ha⁻¹, variando apenas a dose do inoculante contendo a estirpe *A. brasilense* TMA020, correspondente a 150 ou 200 mL por 60.000 sementes, conforme o tratamento. A aplicação foi realizada simultaneamente à semeadura por meio de sistema de aplicação no sulco acoplado à semeadora, garantindo deposição uniforme do inoculante no sulco de semeadura.

Os tratamentos cujo método de inoculação foi via foliar, foi conduzido da seguinte forma: primeiramente foi realizada a inoculação via sulco utilizando volume fixo de calda de 50 L ha⁻¹, variando a dose do inoculante contendo a estirpe *A. brasilense* TMA020 conforme o tratamento, por meio de sistema de aplicação no sulco acoplado à semeadora. Posteriormente, foi realizada aplicação foliar com dose fixa de 300 mL ha⁻¹ do inoculante, utilizando pulverizador costal no estágio fenológico V3 da cultura do milho. A aplicação foliar do inoculante foi realizada no final da tarde, sob condições ambientais adequadas, com baixa velocidade do vento, umidade relativa favorável e ausência de precipitação.

5.6 ADUBAÇÃO E MANEJO

Conforme os resultados da análise química do solo e necessidades da cultura, foi realizada a recomendação da fertilização de base com base no Manual de Adubação e Calagem do Estado do Paraná (Pavinato, 2017). Considerando que as áreas apresentavam teores de argila entre 15% a 25% e teores de P de 35,70 e 36,80 mg dm³ (Tabela 1) o teor de fósforo foi classificado como muito alto em ambas as parcelas, necessitando de fertilização de 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Para a fertilização com K, os solos encontravam-se classificados com teores muito altos, valores acima de 0,45 cmol_c dm³, necessitando assim a adição de 70 kg ha⁻¹ de K₂O. Para fornecimento de N, através do fertilizante uréia (45% N), a dose recomendada foi de 140 kg ha⁻¹.

Para o fornecimento de fósforo e potássio utilizou-se o fertilizante NPK formulado 0-20-20 aplicado através do sistema de distribuição de fertilizante da semeadora, simultaneamente ao plantio da área experimental. A adubação nitrogenada foi realizada manualmente com aplicação de 50 % da dose para os tratamentos T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12 logo após o plantio e com aplicação de mais com 50% do N para o tratamento T3 no estágio V5 do milho.

Durante o ciclo da cultura foi registrado um evento de geada em 25/06, caracterizado

por queda acentuada de temperatura nas primeiras horas da manhã. A ocorrência coincidiu com o período reprodutivo do milho (R2/R3), provocando estresse térmico nas plantas. O evento de geada provocou danos visíveis às plantas, com injúrias foliares expressivas observadas nos dias subsequentes, caracterizando estresse térmico agudo. Apesar do impacto inicial sobre a parte aérea, a cultura manteve capacidade de recuperação e completou o ciclo produtivo, indicando que os danos, embora severos no tecido foliar, não foram letais às plantas.

Durante a condução dos experimentos, os controles de plantas daninhas, pragas e doenças foram realizados de acordo com as necessidades da cultura (Tabela 4).

Tabela 4. Manejo fitossanitário e nutricional realizado durante a condução do experimento.

Data	Estádio	Operação	Princípio ativo / composição
07/03/2025	Pré-emergente	Dessecação	Glufosinato + Glifosato + Saflufenacil
07/03/2025	Pré-emergente	Adjuvante	Espalhante adesivo
14/03/2025	Inicial	Herbicida	Glufosinato + Piroxasulfona
14/03/2025	Inicial	Adjuvante	Espalhante adesivo
27/03/2025	V2	Inseticida	Acefato
27/03/2025	V2	Fertilização foliar	Micronutrientes (K, Mg, S, B, Cu, Mn, Mo, Zn)
04/04/2025	V3	Inseticida	Metomil
11/04/2025	V4	Herbicida	Atrazina + Glifosato
11/04/2025	V4	Inseticida	Acefato
11/04/2025	V4	Adjuvante	Espalhante adesivo
17/04/2025	V5	Fungicida	Triazol + Carboxamida + Estrobilurina + Mancozeb
17/04/2025	V5	Inseticida	Metomil
05/05/2025	V8	Fungicida	Triazol + Carboxamida+Mancozeb
05/05/2025	V8	Adjuvante	Espalhante adesivo

5.7 AVALIAÇÕES

5.7.1 Avaliação biométricas das plantas no estágio vegetativo

Para as avaliações dos parâmetros biométricos os valores foram obtidos pela média da

avaliação de 10 plantas de milho ao atingirem o estágio fenológico V10. Foi avaliada a altura da planta (ALT), realizada com o auxílio de uma trena graduada, onde foi definida como sendo à distância do nível do solo até a folha mais alta da planta, expresso em centímetros e diâmetro basal do colmo (DC), realizado com o auxílio de paquímetro digital, expresso em milímetros. Em seguida, as plantas foram coletadas, sendo retiradas com o auxílio de uma pá reta, juntamente com um volume de solo de aproximadamente $30 \times 30 \times 30$ cm (comprimento $\times$ largura $\times$ profundidade), de modo a preservar o sistema radicular. Posteriormente, as raízes contidas nesse volume foram cuidadosamente lavadas em água corrente para remoção do solo aderido. Após a limpeza, as plantas foram seccionadas na base e separadas em parte aérea (folhas, colmo e bainha) e sistema radicular, sendo ambas as frações pesadas para obtenção da massa fresca da parte aérea (MFPA) e da massa fresca de raízes (MFR).

Em seguida, as amostras foram acondicionadas separadamente em sacos de papel Kraft devidamente identificados e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante. Posteriormente, foram determinadas a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca radicular (MSR), utilizando balança de precisão.

5.7.2 Determinação do teor de N foliar e nos grãos

No estágio fenológico relativo à emissão da inflorescência feminina, foram coletadas as folhas da região oposta e abaixo da espiga principal de dez plantas de cada parcela útil. As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel kraft e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem massa constante e armazenadas para posterior análise dos teores de N.

Após a colheita das espigas e debulha dos grãos, que será detalhada posteriormente, foram retiradas amostras de grãos correspondentes a cada parcela experimental. Estas amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante. As amostras de folhas e grãos foram moídas e submetidas à digestão sulfúrica. Segundo a metodologia da Embrapa (2009) foi realizada a destilação por arraste de vapores, determinando-se então o teor de N, nos tecidos que foram expressos em g kg^{-1} de massa de matéria seca de folha e grão.

5.7.3 Avaliação dos componentes da produção e produtividade

A colheita do experimento foi realizada no dia doze de setembro de dois mil e vinte e

cinco. Os componentes da produção foram determinados pela amostragem de dez espigas por parcela útil. As avaliações realizadas foram: comprimento de espiga (CE), expresso em centímetros, diâmetro de espiga (DE), em milímetros, número de fileiras de grãos por espiga (NFE) número de grãos por fileira na espiga (NGF); número de grãos por espiga (NGE) e peso de mil grãos (PMG), expresso em gramas.

Para a determinação da produtividade de grãos, 30 espigas centrais da parcela útil foram colhidas debulhadas manualmente e os grãos pesados. Aos resultados foram acrescidos os valores da massa de mil grãos das dez espigas, sendo posteriormente transformados em kg ha^{-1} , corrigindo-se os valores para 13% de umidade na base úmida.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados tabulados foram previamente avaliados quanto aos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias. Em função da estrutura fatorial incompleta dos tratamentos e da presença do fator dose como variável quantitativa, a análise estatística não foi conduzida por comparação global de médias. A estratégia analítica foi baseada em análises direcionadas a subconjuntos de tratamentos definidos conforme as hipóteses experimentais. Teste de comparação de médias (Tukey) foi empregado para avaliar a eficiência relativa das estirpes AbV5 e TMA020. Para o fator dose, foram ajustados modelos de regressão descrevendo a resposta das variáveis em função da variação do inoculante, enquanto a análise fatorial permitiu avaliar efeitos específicos de método e dose de inoculação dentro da bactéria TMA020. O teste de Dunnett foi utilizado de forma complementar a análise fatorial para contrastar tratamentos inoculados com os respectivos controles. Todas as análises foram conduzidas adotando nível de significância de 10%, utilizando o software R e o ambiente de desenvolvimento RStudio.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que a estirpe TMA020 de *Azospirillum brasilense* foi geneticamente modificada com o objetivo de aumentar sua eficiência na promoção do crescimento vegetal, realizou-se, previamente à inoculação, a avaliação comparativa de sua capacidade de excreção de amônio e produção de ácido indolacético (AIA) em relação à estirpe comercial AbV5.

Sob condições favoráveis à FBN - ausência de amônio no meio e baixa tensão de oxigênio -, a TMA020 excretou $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de amônio, enquanto a AbV5/AbV6 não apresentou excreção detectável, após 48h de incubação.

Em relação à síntese de AIA, as estirpes não produziram o fitohormônio nas primeiras 12 horas de cultivo (Figura 2). A AbV5/AbV6 iniciou a produção após 24 h, com aumento expressivo até 48 h e estabilização entre 48 e 96 h, mantendo valores próximos de $55\text{--}57 \mu\text{g mL}^{-1}$. A TMA020, por sua vez, apresentou produção a partir de 48 h, com incremento progressivo até 72 h (de aproximadamente 27 para $52 \mu\text{g mL}^{-1}$), atingindo estabilidade às 96 h. A literatura indica que a síntese de auxinas por *Azospirillum* está associada à disponibilidade de triptofano no meio e à fase exponencial de crescimento bacteriano, sendo comum o aumento gradual da produção entre 48 e 96 h (Bashan; De-Bashan, 2010; Cassán *et al.*, 2020). A produção de AIA está diretamente relacionada ao estímulo do crescimento radicular, ao aumento da absorção de nutrientes e à expansão da área foliar, o que fundamenta o interesse agrônomo dessas estirpes como bioestimulantes.

Os resultados obtidos para a TMA020 sugerem que o direcionamento metabólico inicial para a fixação de N pode retardar temporariamente a produção de AIA. Contudo, a estirpe posteriormente alcança níveis semelhantes aos da AbV5/V6 e apresenta a vantagem adicional de excretar amônio, potencialmente disponível para a planta associada.

Diante desse perfil fisiológico promissor, procedeu-se à avaliação do desempenho da estirpe em condições de campo. Os efeitos da inoculação de diferentes doses da TMA020 sobre os parâmetros biométricos, a concentração de N nas plantas e nos grãos e o desempenho agrônomo da cultura do milho foram analisados de forma integrada e discutidos à luz da literatura científica.

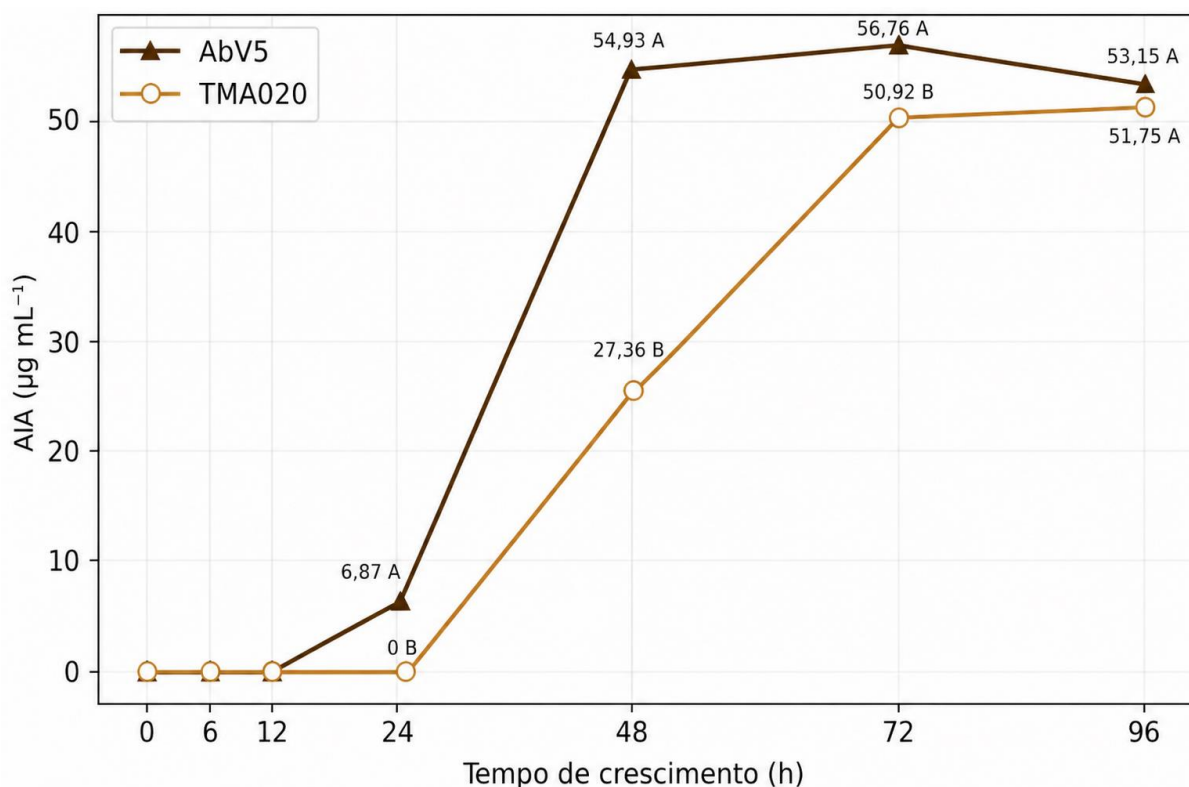


Figura 2. Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes de *A. brasilense* ao longo do tempo de crescimento. Letras maiúsculas diferentes, indicam diferença estatística entre estirpes em um determinado tempo de crescimento.

6.1 DESEMPENHO AGRONÔMICO DAS ESTIRPES AbV5/V6 E TMA020

Considerando que a inoculação via tratamento de sementes é descrita na literatura como o método mais prático e amplamente adotado para a aplicação de *Azospirillum brasilense* em cereais, em função de sua compatibilidade com tecnologias de tratamento industrial e uso consolidado em ensaios de campo (Fukami *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2022), e que a dose recomendada do inoculante comercial à base da estirpe AbV5/V6 de *A. brasilense* é de 100 mL por 60.000 sementes, a estirpe em teste TMA020 foi avaliada nessa condição, em comparação com a estirpe comercial. A padronização da dose e da forma de inoculação permitiu isolar o efeito associado à identidade da estirpe bacteriana, reduzindo interferências relacionadas à tecnologia de aplicação.

Pelo teste de médias de Tukey os tratamentos avaliados, compostos pelas estirpes AbV5/AbV6 e TMA020, com mesma dose e mesma forma de inoculação, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,10$) para os parâmetros biométricos, reprodutivos e nutricionais quando comparados também ao controle com 50% da dose recomendada de N. A altura de plantas, diâmetro de colmo, massa fresca e seca de parte aérea e raízes mantiveram-se

dentro de uma faixa estreita de variação entre tratamentos, indicando estabilidade estrutural da cultura sob as condições experimentais (Tabela 5).

Da mesma forma, os componentes de produção relacionados a espiga (comprimento, diâmetro, número de fileiras, número de grãos por fileira e número total de grãos) não diferiram entre tratamentos. A produtividade de grãos apresentou valores próximos à média geral, sem distinção estatística entre as estirpes inoculadas e o controle nitrogenado. Os coeficientes de variação observados foram compatíveis com experimentos de campo com milho, indicando adequada precisão experimental (Tabela 5).

Os teores de N foliar e nos grãos também não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. Esses resultados indicam que a inoculação com as estirpes AbV5/AbV6 e TMA020 tiveram desempenho agrônômico semelhante ao controle nitrogenado parcial, sem inoculação, porém sem acréscimos detectáveis relacionados a FBN que pudesse gerar incremento do nutriente nas plantas, além do fertilizante nitrogenado.

A ausência de diferenças estatísticas entre tratamentos não implica na ausência de efeito biológico, mas sim expressão moderada da resposta fisiológica em um ambiente onde o suprimento de N não foi limitante. Esse comportamento está em concordância com a literatura que descreve a inoculação com *Azospirillum brasilense* como tecnologia complementar, cuja magnitude de resposta depende da interação entre disponibilidade nutricional, genótipo e condições ambientais (Peloso *et al.*, 2023; Sconieski *et al.*, 2019).

Estudos de campo demonstram elevada variabilidade entre safras e híbridos. Piva *et al.* (2023) registraram resposta vegetativa inconsistente entre anos agrícolas, e Sconieski (2019) evidenciou dependência genética, com incremento observado em apenas um dos híbridos avaliados. Trabalhos adicionais relatam ausência de diferença estatística em variáveis vegetativas mesmo quando há incremento produtivo (Repke *et al.*, 2013), indicando que essas variáveis podem apresentar baixa sensibilidade à inoculação sob determinadas condições. Assim, a estabilidade observada neste experimento está alinhada ao entendimento de que o inoculante atua como modulador fisiológico dependente do contexto ambiental.

Porém, Bashan e De-Bashan (2010), relatam incrementos de 10 a 40% na biomassa aérea de gramíneas inoculadas, atribuídos à produção bacteriana de fitohormônios e ao estímulo do crescimento radicular. Condori *et al.* (2024) registraram aumentos expressivos em altura de plantas, biomassa aérea e radicular, enquanto Hungria *et al.* (2010) observaram ganhos de 6–15% em altura de plantas de milho inoculadas. Em geral, os efeitos da inoculação estão associados principalmente à produção de auxinas bacterianas e ao estímulo do sistema radicular, promovendo maior exploração do solo e eficiência na absorção de nutrientes. Fukami

et al. (2016) e Cassán *et al.* (2020) destacam que os efeitos na parte aérea ocorrem frequentemente de forma indireta, condicionados ao desenvolvimento radicular e à disponibilidade de N, mas relatam que o incremento estrutural pode ser moderado e que sua expressão depende da interação entre estirpe bacteriana, genótipo e manejo nutricional.

Em relação aos componentes de produção relacionado a espiga, a manutenção da arquitetura reprodutiva sem diferenças estatísticas indica que o potencial estrutural da cultura semelhante para as estirpes e para a condição com redução parcial da adubação nitrogenada. Segismundo *et al.* (2020) demonstraram que a inoculação pode influenciar o enchimento de grãos, enquanto o N mineral atua principalmente na expansão do número potencial de grãos. Mas novamente, a dependência genética dessa resposta é reforçada por Sconieski (2019), e Piva *et al.* (2023). Esses autores observaram que alterações morfológicas isoladas nem sempre se convertem em produtividade, apontando evidências de que a inoculação atua predominantemente em processos fisiológicos posteriores à formação estrutural da espiga.

A metanálise ampla, que avaliou 103 experimentos a campo, indicou que a inoculação com *A. brasilense* frequentemente não altera de forma consistente os componentes estruturais da espiga, mas pode influenciar o enchimento de grãos por meio de melhorias na eficiência fisiológica e nutricional da planta (Barbosa *et al.*, 2022). Esse padrão reforça que os efeitos principais da inoculação estão mais associados ao metabolismo do que à morfogênese primária (Condori *et al.*, 2024), especialmente quando o suprimento básico de N é suficiente para sustentar o desenvolvimento inicial da cultura (Oliveira *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2020).

O comportamento observado para o N foliar e no grão reforça a interpretação de que o *Azospirillum* atua predominantemente na eficiência de uso do nutriente, e não necessariamente no aumento absoluto de seu acúmulo. Barbosa *et al.* (2022) indicam que a inoculação pode melhorar a eficiência fisiológica associada ao N, com respostas variáveis na concentração foliar e modestas no grão. Condori *et al.* (2024) demonstraram que o efeito relativo da bactéria diminui à medida que a dose de N mineral aumenta. Estudos adicionais mostram que ganhos produtivos podem ocorrer mesmo sem aumento detectável no N acumulado (Galindo *et al.*, 2019; Piva *et al.*, 2023), evidenciando que a bactéria atua como otimizadora metabólica.

A variação da concentração informada pelo fabricante para ambos os inoculantes de 10^8 UFC mL⁻¹, quando comparada com os resultados da quantificação por microgota realizada previamente à aplicação, indicou diferenças na carga de células viáveis, estimadas em aproximadamente 10^9 UFC mL⁻¹ para o inoculante comercial (AbV5/AbV6) e 10^7 UFC mL⁻¹ para a estirpe TMA020. Variações entre concentração nominal e contagem de UFC viáveis são reportadas na literatura e podem decorrer de fatores como condições de armazenamento,

transporte, formulação e metodologia de quantificação, além de diferenças entre células totais e células viáveis cultiváveis. (Santos *et al.*, 2020).

Do ponto de vista agronômico, a densidade inicial de células aplicadas pode influenciar a colonização rizosférica, a produção de fitohormônios e a intensidade das respostas fisiológicas da planta, uma vez que mecanismos como produção de auxinas, modulação do sistema radicular e incremento na absorção de nutrientes dependem, em parte, da população bacteriana estabelecida. Assim, diferenças de ordem logarítmica na carga celular podem impactar a magnitude da resposta observada (Morais *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a diferença real entre as estirpes é de $\sim 34\times$ em número de células viáveis no momento. A ausência de incremento observada com a inoculação da estirpe TMA020 na dose de 100 mL ha^{-1} pode estar associada à menor densidade inicial de células, e não as características intrínsecas da estirpe.

Tabela 5. Efeito da inoculação da nova estirpe TMA020 de *Azospirillum brasilense* via semente, na dose recomendada (100 mL ha⁻¹) para a estirpe comercial (AbV5 + AbV6), associada a 50% da adubação nitrogenada, sobre parâmetros biométricos e produtivos.

Trat.	ALT	DC	MFPA	MFR	MSPA	MSR	NF	NGC	CE	DE	NFE	NGF	NGE	PMG	PROD
Sem inoculante	164,00 ns	29,11 ns	770,85 ns	69,23 ns	100,88 ns	14,32 ns	31,33 ns	15,85 ns	17,59 ns	46,65 ns	18,00 ns	29,27 ns	527,11 ns	257,45 ns	3,95 ns
AbV5/AbV6	165,97 ns	29,32 ns	815,60 ns	91,64 ns	105,74 ns	19,43 ns	30,77 ns	18,93 ns	18,35 ns	46,35 ns	17,58 ns	31,45 ns	553,08 ns	245,80 ns	4,19 ns
TMA020	163,85 ns	28,52 ns	741,53 ns	70,34 ns	97,60 ns	16,88 ns	28,83 ns	15,39 ns	17,57 ns	45,55 ns	17,50 ns	29,70 ns	520,72 ns	251,95 ns	3,63 ns
Média	164,61	28,99	776,00	77,07	101,41	16,88	30,32	16,73	17,84	46,19	17,69	30,15	533,64	251,73	3,93
Desvio	5,45	0,90	59,23	19,11	5,91	5,43	2,87	2,67	0,53	1,29	0,44	2,34	44,65	22,01	0,48
CV%	3,31	3,12	7,63	24,79	5,83	32,19	9,46	15,95	2,97	2,80	2,47	7,75	8,37	8,74	12,27

Legenda: Trat.: Tratamentos; ALT: Altura de planta em centímetros; DC: Diâmetro do colmo em milímetros; MFPA: massa fresca de parte aérea em gramas por planta; MFR: massa fresca de raízes em gramas por planta; MSPA: massa seca de parte aérea em gramas por planta ; MSR: massa seca de raízes em gramas por planta; NF: nitrogênio foliar em gramas por quilograma; NGC: Nitrogênio de grãos em gramas por quilograma; CE: Comprimento de espiga em centímetros; DE: Diâmetro de espiga em milímetros; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NGF: número de grãos por fileira; NGE: número de grãos por espiga; PMG: peso de mil grãos em gramas; PROD.: Produtividade em toneladas por hectare; CV: coeficiente de variação; ns: valores não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 10

Em síntese, os resultados confirmam o caráter complementar da inoculação com *Azospirillum brasilense*, onde a ausência de diferenças estatísticas representa expressão fisiológica moderada em ambiente nutricionalmente favorável. O inoculante contribui para a manutenção do desempenho produtivo sob redução parcial da adubação nitrogenada, devendo ser interpretado como ferramenta de estabilidade fisiológica e sustentabilidade do sistema produtivo, e não como substituto direto do fertilizante mineral.

6.2 RESPOSTA DA CULTURA ÀS DOSES DE TMA020

Diante da ausência de incrementos biométricos e produtivos com a dose recomendada de inoculação, buscou-se avaliar se diferentes doses poderiam promover tais efeitos, testando-se também a metade da dose, 1,5 vez e o dobro da dose recomendada. A análise de regressão de doses revelou que essa interpretação muda quando a estirpe TMA020 é avaliada em gradiente de aplicação.

A regressão quadrática ajustada para produtividade apresentou elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$), indicando forte relação entre dose do inoculante e rendimento. O modelo revelou comportamento parabólico com ponto mínimo estimado em aproximadamente 75 mL por 60.000 sementes, caracterizando uma faixa subótima de aplicação. A partir dessa dose, observou-se recuperação progressiva da produtividade, com valores máximos registrados nas maiores doses testadas, especialmente em 200 mL (Figura 3).

Esse padrão demonstra que a resposta produtiva da TMA020 não é linear, mas dependente de janela fisiológica de dose. Assim, a avaliação em dose fixa que foi utilizada na comparação entre estirpes, pode subestimar o potencial agrônômico da bactéria, uma vez que sua expressão produtiva máxima ocorre fora da dose originalmente comparada.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram parcialmente os achados de Pelloso *et al.* (2023), que avaliaram cinco doses de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* associadas ou não à adubação nitrogenada em milho destinado à produção de minimilho. Os autores observaram resposta linear da produtividade quando combinada com adubação nitrogenada, com incremento estimado de 6 kg ha⁻¹ para cada 10 mL de inoculante aplicado, além de ajuste quadrático sob ausência de N, com dose ótima próxima de 100–120 mL 60.000 sementes⁻¹. De forma semelhante, verifica-se em ambos os trabalhos, comportamento dependente da disponibilidade de N, com resposta à inoculação condicionada ao ambiente nutricional.

Esse comportamento também é consistente com a literatura que descreve respostas dose-dependentes em rizobactérias promotoras de crescimento. Bashan e De-Bashan (2010) destacam que o efeito de *Azospirillum* raramente segue padrão linear, sendo condicionado pela densidade populacional bacteriana na rizosfera e pela estabilidade da colonização radicular. Cassán *et al.* (2020) reforçam que a magnitude da resposta hormonal depende da concentração bacteriana efetivamente estabelecida no sistema radicular, o que pode gerar zonas de eficiência e ineficiência fisiológica.

Estudos experimentais demonstram que doses intermediárias podem representar custo metabólico sem benefício pleno, enquanto doses elevadas tendem a estabilizar a interação planta–bactéria. Fukami *et al.* (2016) descrevem que a produção de auxinas bacterianas apresenta limiar mínimo para desencadear respostas morfofisiológicas consistentes, o que ajuda a explicar a recuperação produtiva observada em doses altas. Resultados de campo apresentados por Galindo *et al.* (2019) indicam que ajustes na dose de inoculante podem alterar significativamente a magnitude da resposta produtiva, mesmo quando não há alteração direta nos teores foliares de N.

Quando integrada à discussão anterior, a regressão de doses amplia a interpretação dos resultados comparativos. A equivalência entre TMA020 e AbV5/AbV6 em dose fixa não indica ausência de potencial fisiológico da nova estirpe, mas sim que a dose testada não corresponde necessariamente à sua faixa ótima de desempenho. Assim, a TMA020 demonstra comportamento dependente de dose, com potencial produtivo que se expressa apenas em níveis superiores de inoculação.

Esse resultado reforça a noção de que a eficácia agrônômica de inoculantes não deve ser avaliada exclusivamente em doses comerciais padronizadas, mas em curvas dose–resposta que permitam identificar a faixa fisiologicamente eficiente de cada estirpe. A literatura recente aponta que a variabilidade observada em estudos com *Azospirillum* frequentemente decorre de diferenças na densidade de aplicação e na capacidade de colonização radicular (Barbosa *et al.*, 2022; Condori *et al.*, 2024), o que sustenta a importância de abordagens experimentais baseadas em regressão.

Em síntese, a regressão demonstra que a TMA020 possui potencial agrônômico, desde que aplicada em faixa de dose adequada. Esse achado não contradiz os resultados anteriores, mas os complementa, indicando que a ausência de diferença em dose fixa reflete limitação experimental e não ineficiência biológica da bactéria.

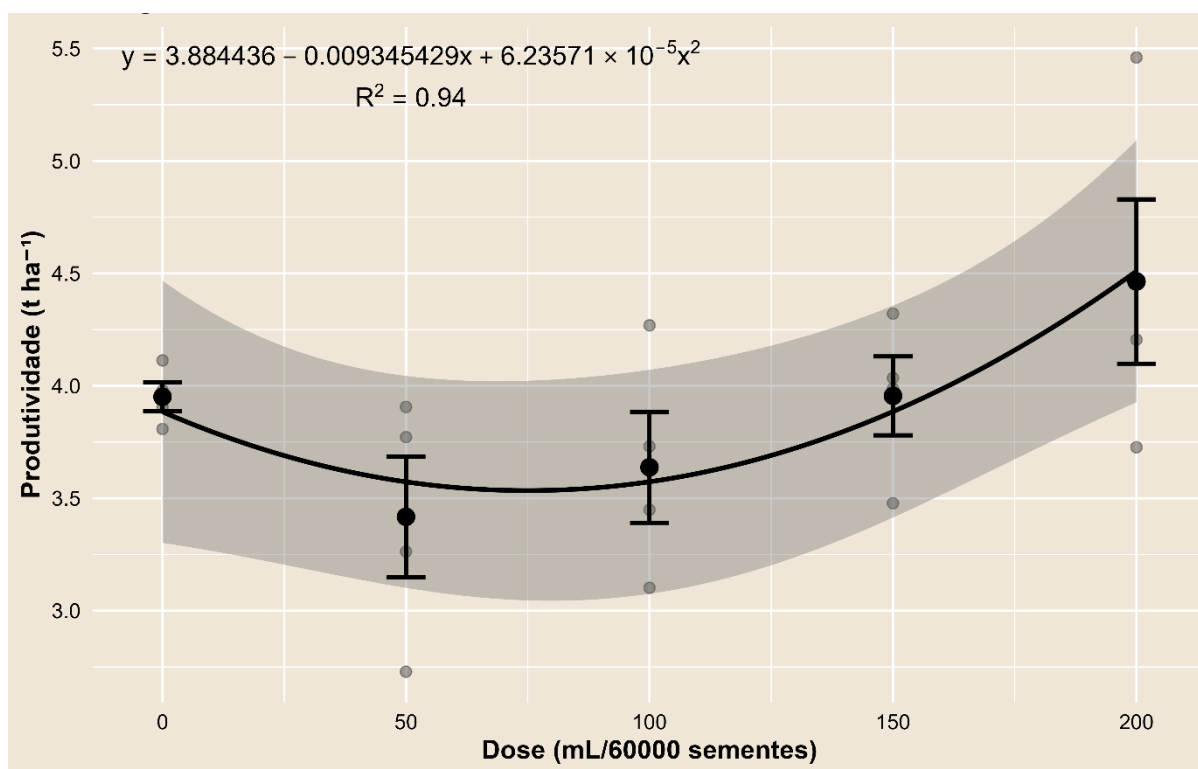


Figura 3. Regressão quadrática da produtividade em função da dose do inoculante a base da estirpe TMA020 de *A. brasilense* inoculada na semente associada a 50% da adubação nitrogenada. **Fonte:** o autor

O maior valor apresentado para a dose de 200 mL ha⁻¹ de 4,45 t ha⁻¹ foi inferior à média estadual de milho segunda safra no Paraná, que foi de 5,16 t ha⁻¹ na safra 2023/24 e 6,20 t ha⁻¹ na safra 2024/25 (SEAB/DERAL, 2025). Essa diferença pode estar associada às condições controladas do experimento, à adubação nitrogenada reduzida adotada (50% da recomendação) e às particularidades ambientais do local experimental. A ocorrência de geada durante o ciclo da cultura, pode ter influenciado parcialmente como fator limitante ao desempenho produtivo do milho.

A ocorrência de geada durante o ciclo da cultura pode ter atuado também como fator limitante ao desempenho produtivo. O milho, por ser uma espécie de origem tropical, apresenta elevada sensibilidade ao estresse por frio, com reduções significativas no crescimento, no desenvolvimento radicular e na atividade fotossintética sob temperaturas subótimas (Farooq *et al.*, 2009). Além disso, a exposição a temperaturas baixas compromete a assimilação de CO₂ e a eficiência fotossintética, afetando diretamente o acúmulo de biomassa e o potencial de rendimento (Burnett; Kromdijk, 2022). Assim, a ocorrência de geada pode ter contribuído para a limitação do enchimento de grãos e, consequentemente, para os valores produtivos inferiores à média estadual observados.

Para as variáveis que não apresentaram regressão significativa em função da dose do inoculante à base da estirpe TMA020, os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, visto que não houve distinção estatística entre as doses testadas. Os parâmetros de N e componentes da espiga mantiveram estabilidade, com médias de $15,60 \pm 1,18$ para N de grãos, $30,71 \pm 3,09$ para N foliar, $17,93 \pm 0,57$ cm para comprimento de espiga, $46,22 \pm 1,16$ mm para diâmetro de espiga, $17,67 \pm 0,66$ fileiras por espiga e $30,23 \pm 2,44$ grãos por fileira. A massa de mil grãos apresentou média de $243,8 \pm 23,87$ g, e o peso de espiga foi de $177,48 \pm 26,25$ g.

As variáveis biométricas também permaneceram estáveis entre as doses, com altura média de plantas de $163,21 \pm 4,62$ cm e diâmetro de colmo de $28,75 \pm 1,25$ mm. A massa fresca e seca de parte aérea e raízes apresentaram médias de $790,44 \pm 94,10$ g, $84,29 \pm 23,38$ g, $101,94 \pm 11,89$ g e $17,95 \pm 5,68$ g, respectivamente. O número de grãos por espiga apresentou média de $533,71 \pm 42,85$, enquanto o número de grãos viáveis foi de $21,89 \pm 1,33$. As variáveis relacionadas ao peso de sementes apresentaram médias de $230,67 \pm 17,16$ g e $56,39 \pm 8,77$ g.

A inoculação influenciou principalmente a produtividade, sem provocar mudanças detectáveis na maioria das variáveis estruturais e nutricionais. Esse comportamento está de acordo com a literatura, que mostra que os efeitos de *Azospirillum* dependem da característica fisiológica avaliada. Assim, aumentos de rendimento podem ocorrer mesmo sem alterações proporcionais na biomassa, nos parâmetros reprodutivos ou na concentração de N nos tecidos (Galindo *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2022). Isso sugere que a bactéria melhora a eficiência fisiológica da planta, otimizando o uso dos recursos disponíveis, sem necessariamente aumentar o tamanho da planta ou o acúmulo total de nutrientes. Esse comportamento indica que a inoculação não provoca um crescimento generalizado da planta, mas sim ajustes metabólicos específicos que se refletem principalmente no rendimento final.

6.3 EFEITO COMBINADO DE MÉTODO E DOSE DE INOCULAÇÃO NA CULTURA

Além das variações resultantes da estirpe ou da dose aplicada, a eficiência agrônômica da inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ser dependente do método de inoculação empregado. Estudos recentes demonstram que diferentes estratégias de aplicação podem alterar significativamente a colonização bacteriana e, consequentemente, a resposta da cultura. Takahashi *et al.* (2024) evidenciaram que o efeito promotor de crescimento varia conforme o método de inoculação (via semente, pulverização foliar ou aplicação via solo) e a estirpe utilizada. Os autores observaram que, embora todas as estirpes tenham sido capazes de colonizar o sistema radicular, a aplicação via solo favoreceu maior promoção de biomassa para

as estirpes comerciais AbV5 e Az39, enquanto a inoculação via semente foi mais eficiente para a estirpe HM053. Considerando a análise de regressão, que indicou recuperação de desempenho produtivo nas maiores doses avaliadas, optou-se por utilizar, no presente ensaio fatorial, as doses que apresentaram maior resposta para a variável produtividade, estabelecendo um esquema fatorial combinando duas doses do inoculante e três métodos de aplicação, com o objetivo de identificar a combinação mais eficiente para maximizar o desempenho agrônomo da cultura e compreender a possível interação entre dose e método para a estirpe TMA020.

A análise fatorial indicou que a maioria das variáveis não apresentou interação significativa entre forma de inoculação e dose do inoculante, permitindo a interpretação dos efeitos principais de forma independente. De modo geral, a forma de inoculação exerceu influência limitada sobre os parâmetros avaliados, enquanto a dose apresentou efeito mais consistente sobre variáveis associadas ao acúmulo de biomassa e produtividade.

As variáveis que não apresentaram efeito significativo na análise fatorial foram descritas por estatística descritiva, sendo expressas como média $\pm$ desvio padrão. A altura de plantas apresentou média de $163,21 \pm 4,62$ cm, enquanto o comprimento de espiga foi de $17,93 \pm 0,57$ cm e o diâmetro de espiga de $46,22 \pm 1,16$ mm. O número de fileiras por espiga e grãos por fileira apresentou médias de $17,67 \pm 0,66$ e $30,23 \pm 2,44$, respectivamente. Os teores de N foliar e de grãos foram de $30,71 \pm 3,09$ e $15,60 \pm 1,18$. A massa fresca de parte aérea e raízes apresentou médias de $790,44 \pm 94,10$ g e $84,29 \pm 23,38$ g, enquanto a massa seca de parte aérea e raízes foi de $101,94 \pm 11,89$ g e $17,95 \pm 5,68$ g. O número de grãos por espiga foi de $533,71 \pm 42,85$ e, o peso de mil grãos apresentou média de $243,8 \pm 23,87$ g. A estabilidade desses parâmetros confirma a ausência de resposta às combinações de forma e dose avaliadas, justificando a apresentação dos resultados por estatística descritiva.

Tabela 6. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no diâmetro de colmo (mm).

Variável: DC	Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	28,13	27,89	28,01 b
Sulco	29,54	29,41	29,48 a
Semente	28,24	28,61	28,42 ab
Média (Dose)	28,64	28,64	28,64
	CV (%)		4,44

Legenda: Diâmetro do colmo (DC). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em milímetros.

O diâmetro de colmo respondeu à forma de inoculação, com superioridade da aplicação via sulco em relação a foliar, enquanto a aplicação via tratamento de semente apresentou comportamento intermediário (Tabela 6). Esse padrão pode estar relacionado à dinâmica de colonização radicular e ao balanço hormonal promovido pela bactéria, que influencia o crescimento vegetativo inicial.

Para o comprimento de espiga, observou-se também o efeito da forma de inoculação, com maiores valores na aplicação via tratamento de semente, seguida da aplicação foliar, enquanto a inoculação via sulco apresentou os menores valores médios (Tabela 7). Esse resultado sugere que o estabelecimento inicial da bactéria no sistema radicular pode influenciar discretamente a arquitetura reprodutiva da espiga. Em contraste, a dose não influenciou essa variável, indicando que o potencial estrutural da espiga é relativamente estável dentro da faixa testada.

Tabela 7. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no comprimento de espiga (cm).

Variável: CE	Dose do inoculante (mL ha⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	18,20	17,78	17,99 ab
Sulco	17,59	17,51	17,55 b
Semente	18,07	18,36	18,22 a
Média (Dose)	17,95	17,88	17,92
CV (%)			3,29

Legenda: Comprimento de espiga (CE). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em centímetros.

Tabela 8. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa fresca de parte aérea da planta (g).

Variável: MFPA	Dose do inoculante (mL ha⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	703.88	797.87	750.88
Sulco	795.37	843.56	819.46
Semente	750.73	852.04	801.39
Média (Dose)	749.99 B	831.16 A	790.57
CV (%)			13.41

Legenda: Massa fresca de parte aérea (MFPA). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em gramas por planta.

Tabela 9. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa fresca de raízes.

Variável: MFR (g)	Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	64.15	95.24	79.69
Sulco	77.09	94.39	85.74
Semente	71.95	110.47	91.21
Média (Dose)	71.07 B	100.03 A	85.55
CV (%)			26.97

Legenda: Massa fresca de raízes (MFR). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em gramas por planta.

Tabela 10. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa seca de parte aérea (g).

Variável: MSPA (g)	Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	92.31	106.91	99.61
Sulco	109.17	111.90	110.54
Semente	96.35	112.17	104.26
Média (Dose)	99.28 B	110.33 A	104.80
CV (%)			13.90

Legenda: Massa seca de parte aérea (MSPA). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em gramas por planta.

Tabela 11. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na massa seca de raízes (MSR).

Variável: MSR (g)	Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)		
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	12.86	20.73	16.79
Sulco	13.86	19.06	16.46
Semente	15.12	22.50	18.81
Média (Dose)	13.95 B	20.76 A	17.36
CV (%)			26.04

Legenda: Massa seca de raiz (MSR). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em gramas por planta.

Tabela 12. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 na produtividade do milho (t ha⁻¹).

Variável: PROD		Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)	
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	3.52	3.95	3.74
Sulco	3.76	3.85	3.80
Semente	3.96	4.46	4.21
Média (Dose)	3.75 B	4.09 A	3.92
CV (%)			11.12

Legenda: Produtividade (PROD). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em toneladas por hectare.

A dose do inoculante, por sua vez, apresentou efeito consistente sobre as massas fresca de parte aérea e raiz (Tabelas 8 e 9), massas secas de parte aérea e de raiz (Tabelas 10 e 11) e produtividade, com superioridade da dose de 200 mL em relação a 150 mL (Tabela 12). Esse resultado confirma o padrão observado na regressão de doses, indicando que a TMA020 responde positivamente ao aumento da densidade de aplicação, independentemente da forma de inoculação. A convergência entre o fatorial e a regressão reforça a interpretação de que o principal fator determinante do desempenho da estirpe é a dose aplicada.

Tabela 13. Efeito do método e da dose de inoculação da estirpe TMA020 no peso de mil grãos (g).

Variável: PMG (g)		Dose do inoculante (mL ha ⁻¹)	
Método de inoculação	150	200	Média (Método)
Foliar + Sulco	197.25 bB *	246.90 aA	222.07
Sulco	244.65 aA	220.22 aA	232.44
Semente	228.85 abA	227.93 aA	228.39
Média (Dose)	223.58	231.68	227.63
CV (%)			12.77

Legenda: Peso de mil grãos (PMG). Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferença estatística entre os métodos de inoculação, enquanto letras maiúsculas distintas na linha indicam diferença estatística entre as doses do inoculante, pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. * indica diferença do tratamento fatorial em relação ao adicional pelo teste de Dunnett. CV = coeficiente de variação. Valores expressos em gramas.

O peso de mil grãos apresentou tendência de interação entre forma e dose, indicando que a resposta à dose foi mais evidente em algumas formas de inoculação do que em outras. Esse comportamento sugere que o efeito da bactéria sobre o enchimento de grãos pode depender da eficiência de colonização inicial e da estabilidade da interação planta–bactéria ao longo do ciclo (Tabela 13).

A comparação entre o tratamento adicional, correspondente ao controle adubado com 50% da dose recomendada de N mineral, sem inoculação, e o conjunto fatorial não indicou diferenças significativas para a maioria das variáveis avaliadas. Esse resultado evidencia que os tratamentos envolvendo inoculação, nas combinações de dose e método testadas, apresentaram comportamento agrônômico semelhante ao controle nitrogenado parcial. Apenas a variável peso de mil grãos apresentou diferença significativa ($p \leq 0,10$), indicando maior sensibilidade desse componente produtivo às alterações no manejo

A comparação direcionada realizada pelo teste de Dunnett, adotando o tratamento adicional (50% N sem inoculação) como controle, indicou efeito negativo para o método sulco+foliar na dose 150mL ha^{-1} em relação ao adicional, com redução média de 60,2 gramas em relação ao controle. Esse resultado sugere que, nas condições avaliadas, a inoculação não foi capaz de superar o desempenho do controle nitrogenado isolado e, em alguns casos, pode ter representado custo fisiológico adicional à planta. Tal comportamento pode estar associado à competição por fotoassimilados ou à ausência de limitação nutricional suficientemente severa para que o benefício da associação com *Azospirillum* se expressasse plenamente.

Assim como observado por Pelloso *et al.* (2023), os efeitos mais consistentes ocorreram em variáveis relacionadas ao crescimento vegetativo e à produtividade. A estabilidade dos parâmetros indica que a inoculação não promove alterações estruturais amplas, mas atua de forma seletiva em processos fisiológicos relacionados à eficiência de conversão metabólica. Esse padrão é consistente com a literatura, que descreve o efeito de *Azospirillum* como dependente do traço avaliado, podendo gerar incremento produtivo sem necessariamente alterar biomassa ou concentração absoluta de nutrientes (Galindo *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2022).

Quando integrados aos resultados comparativos entre estirpes e à regressão de doses, a estirpe não se destacou em dose fixa em relação à bactéria comercial, mas demonstrou potencial produtivo quando aplicada em faixa de dose superior. Esse padrão reforça a interpretação de que a eficácia agrônômica da inoculação depende mais do ajuste de dose do que da forma de aplicação, dentro das condições avaliadas.

Takahashi *et al.*, (2024) demonstraram que o melhor método de inoculação é estirpe-dependente, evidenciando que a aplicação via solo favorece determinadas estirpes enquanto

outras respondem melhor à inoculação via semente. Essa dependência biológica sugere que respostas inconsistentes frequentemente relatadas em experimentos com inoculantes não representam falhas da tecnologia em si, mas refletem incompatibilidades entre estirpe, método de aplicação e ambiente.

Em síntese, os resultados indicam que a TMA020 atua predominantemente na eficiência fisiológica da planta, promovendo ganhos produtivos sem expansão estrutural proporcional. A seletividade da resposta sugere ajuste metabólico e otimização do uso de assimilados, e não crescimento vegetativo indiscriminado. Assim, a inoculação deve ser interpretada como ferramenta de manejo voltada à eficiência produtiva, cuja expressão depende da dose adequada e do contexto fisiológico da cultura.

O comportamento observado para o N foliar e no grão é compatível com a variabilidade descrita na literatura. A metanálise conduzida por Barbosa *et al.* (2022), envolvendo 103 ensaios de campo, indica que a inoculação com *A. brasilense* pode promover aumento na concentração de N em folhas, acompanhado de ganhos de produtividade e incremento modesto de N nos grãos, sugerindo que os efeitos do microrganismo tendem a se expressar inicialmente na fase vegetativa. Entretanto, essa resposta depende fortemente da disponibilidade de N mineral. Condori *et al.* (2024) observaram que, sob fornecimento parcial de N, a inoculação não elevou diretamente os teores foliares, mas aproximou o desempenho de plantas inoculadas sem ureia ao de plantas apenas fertilizadas. Os autores também destacam que as diferenças entre inoculados e não inoculados diminuem à medida que a dose de N aumenta, indicando que o efeito relativo da bactéria é mais evidente em cenários de suprimento moderado.

7 CONCLUSÃO

Os efeitos observados foram mais consistentes em desempenho produtivo/biomassa em parâmetros como biomassa de parte aérea e radicular, diâmetro de colmo e produtividade.

A eficiência da inoculação esteve mais associada à dose do que ao método; o diâmetro de colmo respondeu ao método sulco e o comprimento de espiga ao método semente, mas sem efeito consistente sobre a produtividade.

A inoculação, independente da dose ou forma de inoculação não alterou de forma consistente o teor de N foliar e nos grãos.

A dose de 200 mL ha⁻¹ apresentou o melhor desempenho, associando maior produtividade e produção de biomassa, com tendência positiva da produtividade com o aumento da dose.

A ocorrência de geada durante o ciclo atuou como fator limitante adicional ao desempenho produtivo.

A condução de novos ensaios em diferentes safras e a avaliação de doses superiores a 200 mL ha⁻¹, são necessários a fim de confirmar a tendência das respostas observadas.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, S. C. *et al.* Enhancing soybean yield through co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp. and ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* HM053. **Plant and Soil**, v. 513, n. 2, 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-025-07330-9>. Acesso em: 10 fev. 2026.
- ARGENTEL-MARTÍNEZ, L. *et al.* Biotechnological advances in plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-024-04231-4>. Acesso em: 05 fev. 2026.
- BACKER, R. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>. Acesso em: 03 out. 2025.
- BARBOSA, J. Z. *et al.* Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>. Acesso em: 12 nov. 2025.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth — a critical assessment. **Advances in Agronomy**, 2010. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113\(10\)08002-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113(10)08002-8). Acesso em: 18 set. 2025.
- BOAVENTURA MARQUES, J. *et al.* Inoculação de *Azospirillum brasilense* e aplicação de doses de nitrogênio em cobertura no milho. **Global Science & Technology**, v. 13, n. 1, 2020. Acesso em: 22 set. 2025.
- BOMFIM, C. A. *et al.* Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>. Acesso em: 07 jan. 2026.
- BURNETT, A. C.; KROMDIJK, J. Can we improve the chilling tolerance of maize photosynthesis through breeding? **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 10, p. 3138–3156, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erac045>. Acesso em: 08 fev. 2026.
- CALEGARI, A. Alternativa de rotação de culturas para plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v. 80, n. 2, 2004. Disponível em: <https://www.plantiodireto.com.br/artigos/860>. Acesso em: 22 out. 2025.
- CASSÁN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 promote seed germination and early seedling growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>. Acesso em: 29 set. 2025.
- CASSÁN, F. *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>. Acesso em: 11 fev. 2026.

CASSÁN, F. *et al.* Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by plant-growth-promoting rhizobacteria belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>. Acesso em: 05 dez. 2025.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>. Acesso em: 16 jan. 2026.

CASSMAN, K. G. *et al.* Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. **Ambio**, v. 31, n. 2, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.132>. Acesso em: 06 dez. 2025.

CIAMPITTI, I. A.; VYN, T. J. Understanding global and historical nutrient use efficiencies for closing maize yield gaps. **Agronomy Journal**, v. 106, n. 6, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2134/agronj14.0025>. Acesso em: 15 nov. 2025.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, DF, v. 12, safra 2024/25, n. 12, set. 2025. Acesso em: 20 jan. 2026.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, DF, v. 13, safra 2025/26, n. 4, jan. 2026. Acesso em: 05 fev. 2026.

CONDORI, T. *et al.* Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to reduce nitrogen fertilization in cultivating purple maize. **Microorganisms**, v. 12, n. 10, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12102107>. Acesso em: 10 fev. 2026.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/622470>. Acesso em: 14 nov. 2025.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. **Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses**. In: STEWART, W. D. P. (ed.). Nitrogen fixation by free-living micro-organisms. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. Acesso em: 18 set. 2025.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Springer, 1987. Acesso em: 21 out. 2025.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/330496>. Acesso em: 16 nov. 2025.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema de produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 10 fev. 2026.

ERISMAN, J. W. *et al.* How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ngeo325>. Acesso em: 06 dez. 2025.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. Acesso em: 22 set. 2025.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cereals**. Rome: FAO, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc3020en/cc3020en.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2026.

FAROOQ, M. *et al.* Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological approaches. **Crop & Pasture Science**, v. 60, n. 6, p. 501–516, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/cp08427>. Acesso em: 15 nov. 2025.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>. Acesso em: 09 jan. 2026.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>. Acesso em: 05 jan. 2026.

GALINDO, F. S. *et al.* Impacts of corn stover management and fertilizer application on soil nutrient availability and enzymatic activity. **Scientific Reports**, v. 12, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-06042-9>. Acesso em: 03 fev. 2026.

GALINDO, F. S. *et al.* Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 4, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2018.07.0481>. Acesso em: 27 out. 2025.

GALLOWAY, J. N. *et al.* Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v. 320, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1136674>. Acesso em: 06 dez. 2025.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, 1951. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/PP.26.1.192>. Acesso em: 15 nov. 2025.

GUIMARÃES, V. F. *et al.* Agronomic efficiency of inoculant based on *Azospirillum brasilense*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 22, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5897/ajar2016.11978>. Acesso em: 18 nov. 2025.

HIREL, B. *et al.* The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erm097>. Acesso em: 19 out. 2025.

HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>. Acesso em: 21 nov. 2025.

HUNGRIA, M. *et al.* Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.21150>. Acesso em: 10 fev. 2026.

HUNGRIA, M. *et al.* Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.21150>. Acesso em: 10 fev. 2026.

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 01 out. 2025.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: Embrapa Soja, 2011. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/879471>. Acesso em: 22 nov. 2025.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/468512>. Acesso em: 15 nov. 2025.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: **Biological Nitrogen Fixation.** 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>. Acesso em: 08 nov. 2025.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica do nitrogênio.** In: Bioinsumos na cultura da soja. Brasília: Embrapa, 2022. Acesso em: 20 jan. 2026.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>. Acesso em: 10 nov. 2025.

KANEKO, F. H. *et al.* Synergistic effects of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen sources on maize production. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.07.p7895>. Acesso em: 27 set. 2025.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde.** Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928. Acesso em: 20 out. 2025.

KUYPERS, M. M. M. *et al.* The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>. Acesso em: 10 jan. 2026.

LASSALETТА, L. *et al.* 50-year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems. **Environmental Research Letters**, v. 9, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105011>. Acesso em: 03 fev. 2026.

MACHADO, H. B. *et al.* Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1139/m91-092>. Acesso em: 21 out. 2025.

MAGALHÃES, P. C. *et al.* **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Acesso em: 02 out. 2025.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. Acesso em: 25 out. 2025.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA nº 13**, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view>. Acesso em: 12 jan. 2026.

MORAIS, T. P. *et al.* Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160034>. Acesso em: 22 nov. 2025.

NAÇÕES UNIDAS. **População mundial chegará a 9,9 bilhões em 2054**. 2024. Disponível em: <https://news.un.org/pt/>. Acesso em: 01 set. 2025.

OLIVEIRA, I. J. *et al.* Inoculation with *Azospirillum brasilense* increases maize yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 5, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-018-0118-z>. Acesso em: 18 nov. 2025.

ONA, O. *et al.* Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.048>. Acesso em: 04 nov. 2025.

ORDÓÑEZ, R. A. *et al.* Modern maize hybrids have increased grain yield and efficiency tolerances to nitrogen-limited conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 168, 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2025.127621>. Acesso em: 10 fev. 2026.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. **Melhoramento do milho**. In: BORÉM, A. (ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. Acesso em: 22 set. 2025.

PAVINATO, P. S. **Manual de adubação e calagem para o Estado do Paraná**. Curitiba: SBCS/NEPAR. Acesso em: 12 dez. 2025.

PEDROSA, F. O. *et al.* The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>. Acesso em: 27 nov. 2025.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation genes of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01042.x>. Acesso em: 08 nov. 2025.

PELLOSO, M. F. *et al.* Agronomic performance of baby corn in response to *Azospirillum brasilense*. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14618>. Acesso em: 02 fev. 2026.

PEOPLES, M. B. *et al.* The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to agricultural productivity. **Symbiosis**, v. 48, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03179980>. Acesso em: 10 fev. 2026.

PIVA, J. T. *et al.* *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization in maize succession. **Revista Ceres**, v. 70, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034-737X202370030001>. Acesso em: 10 fev. 2026.

RAJESH KUMAR; PAREEK, B. L. Effect of organic manure, *Azospirillum* and inorganic fertilizer on wheat growth and yield. **Pharma Innovation**, v. 11, n. 2, 2022. Acesso em: 03 jan. 2026.

REPKE, R. A. *et al.* *Azospirillum brasilense* efficiency in combination with doses of nitrogen in maize development. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, 2013. Acesso em: 14 out. 2025.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.environ.032108.105046>. Acesso em: 12 jan. 2026.

RODRIGUEZ CACERES, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.44.4.990-991.1982>. Acesso em: 06 nov. 2025.

SADIQ, M. *et al.* Enhancing environmental quality and mitigating climate change: renewable energy policy perspective. **Gondwana Research**, v. 148, 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gr.2025.07.007>. Acesso em: 08 fev. 2026.

SANTOS, M. S. *et al.* Compatibility of *Azospirillum brasilense* with pesticides used for treatment of maize seeds. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–8, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8833879>. Acesso em: 03 fev. 2026.

SANTOS, M. S. *et al.* Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.36783/18069657rbcs20200128>. Acesso em: 03 fev. 2026.

SCUDELETTI, D. *et al.* Inoculation with *Azospirillum brasilense* enhances sugarcane biomass production. **European Journal of Agronomy**, v. 144, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>. Acesso em: 17 dez. 2025.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ (SEAB). Departamento de Economia Rural (DERAL). Paraná – **Comparativo de área, produção e rendimento de culturas selecionadas – Safras 2023/24 – 2024/25 – 2025/26**. Curitiba: SEAB/DERAL, 2025. Disponível em: <https://www.parana.pr.gov.br/aen/Noticia/Boletim-do-Deral-preve-recorde-de-463-milhoes-de-toneladas-na-safra-de-graos-2425>. Acesso em: 10 fev. 2026.

SEGISMUNDO, V. D. *et al.* Effect of *Azospirillum brasilense* on yield components of maize. **Científica**, v. 48, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2020v48n4p351-356>. Acesso em: 10 fev. 2026.

SKONIESKI, F. R. *et al.* Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on corn yield. **Agronomy**, v. 9, n. 12, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9120812>. Acesso em: 28 nov. 2025.

SOUMARE, A. *et al.* Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9081011>. Acesso em: 22 dez. 2025.

SUTTON, M. A. *et al.* Too much of a good thing. **Nature**, v. 472, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/472159a>. Acesso em: 03 jan. 2026.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Acesso em: 21 out. 2025.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. Acesso em: 22 set. 2025.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Acesso em: 15 nov. 2025.

TAKAHASHI, W. Y. *et al.* Impact of seed-applied fungicide and insecticide on *Azospirillum brasilense*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13645>. Acesso em: 05 fev. 2026.

TAKAHASHI, W. Y. *et al.* Tracking maize colonization and growth promotion by *Azospirillum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 215, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108979>. Acesso em: 08 fev. 2026.

TELLES, T. S. *et al.* Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>. Acesso em: 10 fev. 2026.

TILMAN, D. *et al.* Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **PNAS**, v. 108, n. 50, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>. Acesso em: 22 jan. 2026.

TRIVEDI, P. *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>. Acesso em: 10 fev. 2026.

VERDOUW, H. *et al.* Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0). Acesso em: 10 fev. 2026.

VOLFSON, V. *et al.* Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>. Acesso em: 22 nov. 2025.

XIA, Z. *et al.* Split nitrogen application increases maize root growth and nitrogen use efficiency. **The Crop Journal**, v. 13, n. 2, 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cj.2025.01.010>. Acesso em: 09 fev. 2026.

ZHANG, X. *et al.* Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>. Acesso em: 10 fev. 2026.

ZHAO, Z. *et al.* Exploring and predicting nitrogen fertilizer use efficiency of maize–soybean intercropping systems. **Soil and Tillage Research**, v. 252, 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2025.106603>. Acesso em: 10 fev. 2026.