

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

Bioinsumos na cultura da soja

*Maurício Conrado Meyer
Adeney de Freitas Bueno
Sérgio Miguel Mazaro
Juliano Cesar da Silva*

Editores Técnicos

*Embrapa
Brasília, DF
2022*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000 Fax: (43) 3371 6100
www.embrapa.br/
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Soja

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Alvadi Antonio Balbinot Junior*

Secretária-Executiva: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

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

Supervisão editorial: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

Normalização bibliográfica: *Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico e editoração eletrônica: *Edil Gomes*

Capa: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

1ª edição: 2022

1ª impressão: PDF digitalizado

O conteúdo do livro, bem como a exatidão das citações e referências, são de inteira responsabilidade dos autores.

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Bioinsumos na cultura da soja / Maurício Conrado Meyer... [et al.] editores técnicos – Brasília,
DF: Embrapa, 2022.
550 p.

ISBN: ISBN: 978-65-87380-96-4

1. Soja. 2. Produção vegetal. 3. Insumo. 4. Fertilizante. I. Meyer, Maurício Conrado. II. Bueno, Adeny de Freitas. III. Mazaró, Sérgio Miguel. IV. Silva, Juliano Cesar da.

CDD: 633.34: 631.8 (21. ed.)

Valéria de Fátima Cardoso (CRB 9/1188)

©Embrapa, 2022

Fixação biológica do nitrogênio

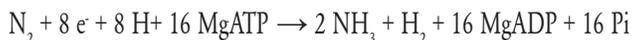
*Mariangela Hungria
Marco Antonio Nogueira*

Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e, com maior frequência, sua baixa disponibilidade é fator limitante à produção agrícola. Isso decorre de seu papel desde a base da vida, na composição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), aminoácidos e proteínas, além de várias moléculas essenciais à vida, como a clorofila. No entanto, a disponibilidade de N é limitada em muitos solos, particularmente nos trópicos e, embora a atmosfera terrestre consista em 78% de gás nitrogênio (N_2), nenhuma planta ou animal é capaz de utilizar essa forma. Como consequência, a agricultura moderna tem sido altamente dependente de fertilizantes industriais à base de N, o que foi intensificado a partir da década de 1960 com a “Revolução Verde”. O processo Haber-Bosch de síntese de fertilizante nitrogenado, porém, necessita alto consumo de combustíveis fósseis para atingir temperaturas e pressões elevadas, necessárias para quebrar a tripla ligação entre os átomos de N_2 . Além disso, dióxido de carbono (CO_2) é liberado na síntese, transporte e utilização do fertilizante e a eficiência de uso pelas plantas é de apenas 30-60% (Lara-Cabezas; Pádua, 2007; Reetz Jr., 2016), resultando em perdas por lixiviação e emissão de óxidos de nitrogênio (NO_x), como o óxido nitroso (N_2O), que é 292 vezes mais ativo como gás de efeito estufa (GEE) do que CO_2 . Por fim, diversos países importam a maior parte dos fertilizantes nitrogenados consumidos na agricultura, por exemplo, 80% do N no Brasil, criando dependência externa atrelada a moedas estrangeiras. Essas limitações resultam em custos econômicos elevados e problemas ambientais significativos, demandando o desenvolvimento de estratégias para diminuir a dependência em fertilizantes nitrogenados (Hungria; Campo, 2005; Hungria et al., 2007, 2013; de Bruijn, 2015; Reis Junior et al., 2018; Arrese-Igor et al., 2021).

Há bilhões de anos, antes que qualquer vegetal habitasse a Terra, houve um evento na evolução de um procarioto (procariotos são microrganismos unicelulares que não possuem núcleo verdadeiro nem organelas em seu citoplasma), bactéria ou arqueia, que passou a sintetizar uma enzima denominada nitrogenase, que se mantém conservada até os dias de hoje, e é capaz de

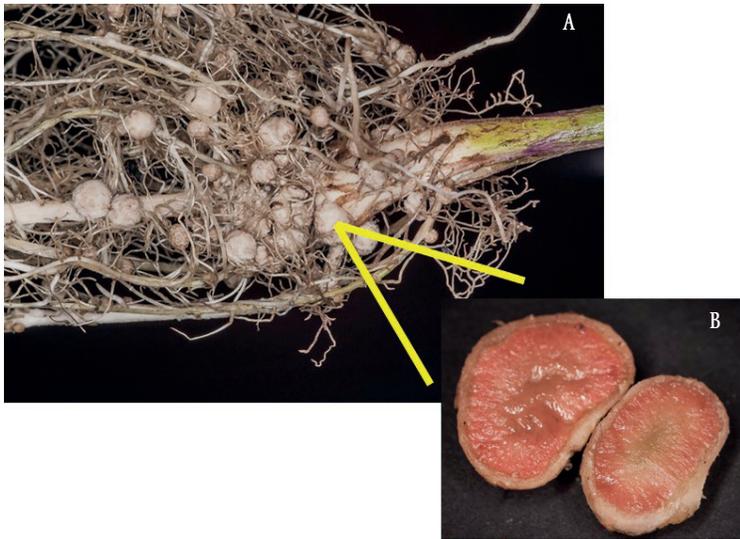
quebrar a tripla ligação do N_2 e transformá-lo em amônia (NH_3), processo denominado como fixação biológica do nitrogênio (FBN), conforme a reação:



O conjunto básico de genes responsáveis pela síntese e atividade da nitrogenase, denominados genes *nif* e *fix*, foi transferido horizontalmente para outros procariotos, que hoje são denominados como diazotróficos (di = dois, azoto = nitrogênio; trófico = relativo à alimentação), estando presente em diversas espécies de bactérias e arqueias, habitando todos os ecossistemas terrestres e os oceanos (Ormeño-Orrillo et al., 2013).

Com o surgimento das plantas, essas bactérias passaram a se associar a elas com diferentes graus de interação, nas proximidades das raízes (rizosféricas), ou em relações mais íntimas (endofíticas). Há cerca de 200 milhões de anos ocorreu um evento de grande relevância, em que algumas dessas bactérias, chamadas coletivamente de rizóbios, passaram a se associar a diversas espécies de plantas da família Fabaceae (sinônimo Leguminosae), popularmente denominadas leguminosas, com grau elevado de interação, estabelecendo uma simbiose. O processo de interação dos rizóbios com as leguminosas engloba uma intensa troca de sinais moleculares e expressão de genes em ambos os parceiros, e que resulta na formação de estruturas típicas principalmente nas raízes, denominadas nódulos (Figura 1), dentro dos quais os rizóbios se diferenciam em uma forma denominada de bacteroide, ficando em compartimentos denominados simbiossomas, onde ocorre o processo de FBN. Na simbiose com leguminosas as bactérias alojadas nos nódulos fornecem o N fixado para a planta hospedeira que, por sua vez, retorna com fontes de carbono destinadas ao suprimento energético dos microssimbiontes. A leghemoglobina, uma hemoproteína responsável pelo fino ajuste das necessidades específicas de oxigênio dos nódulos, representa um marcador visual de que a FBN está ativa, com coloração interna rósea (Figura 1). Mais detalhes sobre a diversidade, a atividade e os habitats de procariotos diazotróficos, bem como sobre o complexo processo de formação e funcionamento dos nódulos em leguminosas podem ser consultados em Hungria et al. (1994), Hungria e Campo (2005), Ormeño-Orrillo et al. (2013), de Bruijn (2015), Reis Junior et al. (2018) e Arrese-Igor et al. (2021).

A simbiose não ocorre em todas as leguminosas, mas é particularmente comum na subfamília Fabaceae, que inclui muitas espécies arbóreas, forrageiras, adubos verdes e culturas de grãos. As estimativas são de que a FBN contribui com cerca de 65% de todo o N reativo introduzido no ciclo do N no planeta, ou 96% da fixação por processos naturais, sendo considerada como o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese. Se a associação entre estes microrganismos diazotróficos e as plantas for eficiente, o N fixado pode suprir todas as necessidades de diversas espécies de importância econômica e ambiental, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. No caso da simbiose com leguminosas, são relatados aportes de centenas de kg de N por ha por ciclo (Ormeño-Orrillo et al., 2013). Comparativamente, as principais vantagens e desvantagens da FBN em simbiose em relação ao uso de fertilizantes nitrogenados são apresentadas na Tabela 1. O caso mais bem-sucedido de contribuição da FBN na agricultura, reconhecido internacionalmente, ocorre com a cultura da soja no Brasil (Hungria; Mendes, 2015; Hungria; Nogueira, 2019), resultado de mais de meio século de investimentos em pesquisa, transferência de tecnologia, validação e adoção pelos agricultores.



Fotos: Mariângela Hungria (A) e Marco Antonio Nogueira (B)

Figura 1. Raiz de soja nodulada (A) e corte de nódulo (B), mostrando a coloração rósea interna indicativa de atividade da nitrogenase, pela presença de leghemoglobina funcional.

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens da utilização de fertilizantes nitrogenados e do processo de fixação biológica do N_2 (FBN) em leguminosas.

Vantagens	Desvantagens
Fertilizantes nitrogenados	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Disponibilidade imediata para as plantas; 2. Crescimento inicial mais rápido das plantas; 3. Plantas inicialmente mais verdes; 4. Em geral o custo energético para a sua absorção pelas plantas é inferior ao custo da FBN. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gasto energético elevado para a sua síntese, transporte e utilização; 2. Em condições tropicais, em geral no máximo 50% do fertilizante nitrogenado aplicado é aproveitado pelas plantas; 3. Perdido facilmente por desnitrificação, volatilização, lixiviação; 4. Poluição de águas; 5. Emissão de gases de efeito estufa.
Fixação biológica do N_2	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Menor custo para o agricultor; 2. Melhor aproveitamento do N pelas plantas, translocação mais eficiente do N para os grãos; 3. Menores impactos ambientais; 4. Melhoria e manutenção da fertilidade do solo. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Plantas dependentes da FBN podem ter crescimento inicial mais lento, pois há necessidade de formação e início de atividade dos nódulos; 2. As exigências nutricionais das plantas dependentes da fixação do N_2 são mais elevadas, pois precisam atender às suas necessidades, das bactérias e da simbiose; 3. Plantas dependentes da fixação do N_2 são mais sensíveis a estresses abióticos; 4. Estirpes de bactérias fixadoras e genótipos de plantas diferem em sua efetividade e o processo de seleção e melhoramento de ambos parceiros precisa ser contínuo.

Fonte: Modificado de Hungria et al. (1994) e Hungria e Campo (2005).

Histórico da seleção de estirpes para a cultura da soja no Brasil

Conforme comentado, a simbiose resultou de milhões de anos de coevolução entre rizóbios e as respectivas leguminosas hospedeiras. Consequentemente, como a soja não é nativa do Brasil, nossos solos não abrigam naturalmente estirpes compatíveis dessas bactérias de modo que, em áreas de primeiro cultivo,

existe ampla documentação de que a nodulação é zero ou próxima de zero (Hungria et al., 1994), o que também foi confirmado com técnicas mais avançadas de biologia molecular (Ferreira; Hungria, 2002). Frente a isso, estirpes simbiotes da soja foram trazidas do exterior, principalmente de universidades norte-americanas e, posteriormente, da Austrália, para avaliação nas condições edafoclimáticas e com genótipos de soja utilizados no país.

Os primeiros estudos de avaliação de estirpes no Brasil datam da década de 1920, da Seção de Bacteriologia Agrícola do Instituto Agrônomo de Campinas, com estirpes norte-americanas e distribuição de inoculantes para os agricultores, mas a cultura ainda não tinha importância econômica para o país e os trabalhos desaceleraram. Nas décadas de 1950 e 1960, com a expansão da cultura na Região Sul, começaram estudos com estirpes norte-americanas e australianas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre-RS) e na atual Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ). Como resultado dessas avaliações, a primeira lista de estirpes recomendadas pelos pesquisadores para o uso em inoculantes comerciais foi publicada em 1956. Decisiva para a história de sucesso da FBN na soja foi a participação dos pesquisadores Prof. Dr. João Ruy Jardim Freire (UFRGS) e Dra. Johanna Döbereiner (Embrapa Agrobiologia) na “Comissão Nacional da Soja” na década de 1960, indicando que a FBN deveria ser um parâmetro considerado nos programas de melhoramento. Graças a esses dois pesquisadores, a seleção de estirpes para a cultura da soja passou a ser prioritária no Brasil (Hungria et al., 1994, 2005; Araujo, 2017).

A primeira estirpe de relevância para a soja brasileira foi a SEMIA 566 (SEMIA, “Seção de Microbiologia Agrícola”, da extinta Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Fepagro, RS), isolada em 1966 de um nódulo da cultivar Hardee, em vaso de Leonard que havia recebido inoculante norte-americano, quando se buscava superar problemas de nodulação a campo. A SEMIA 566 foi utilizada em inoculantes comerciais no período de 1966 a 1978 (Hungria et al., 1994, 2005; Hungria; Mendes 2015).

Outra estirpe, a SEMIA 587, foi isolada em 1967, a partir de uma planta de soja em Santa Rosa, RS e provou ser eficiente em diversos ensaios a campo (Freire; Vidor, 1981), sendo utilizada em inoculantes comerciais no período de 1968 a 1975 (Hungria et al., 1994, 2005; Hungria; Mendes, 2015).

Com a expansão da soja para os Cerrados na década de 1970, as estirpes selecionadas na Região Sul não apresentavam bom desempenho, demandando novos estudos. A partir de um nódulo de soja da linhagem IAC-70-559, foi isolada e selecionada a estirpe 29W (=SEMIA 5019) e seu bom desempenho nesse bioma, juntamente com a SEMIA 587, levaram à recomendação dessas duas estirpes em 1979, permanecendo entre as estirpes autorizadas para a produção de inoculantes até a atualidade (Peres; Vidor, 1980; Hungria et al., 1994, 2005, 2006a). Essas duas estirpes estão classificadas na espécie *Bradyrhizobium elkanii*.

Os patamares de rendimento de novas cultivares de soja e o avanço da cultura nos Cerrados incentivaram a busca por estirpes com maior capacidade de FBN, competitivas e adaptadas a condições edafoclimáticas mais restritivas. A partir de uma abordagem criativa, de avaliação da atividade da enzima nitrogenase em nódulos de soja previamente inoculada e passando por período de adaptação nos Cerrados (Peres et al., 1984; Hungria; Vargas, 2000), foram obtidas duas estirpes, atualmente classificadas como *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 (=SEMIA 5079) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7 (=SEMIA

5080) (Vargas et al., 1992; Peres et al., 1993; Hungria; Mendes, 2015). A estirpe CPAC 7 foi obtida a partir de uma subcultura da estirpe CB 1809, por sua vez considerada uma subcultura de USDA 136, que é derivada da USDA 122. As características buscadas na seleção da CPAC 7 foram a maior capacidade competitiva e de nodular a cultivar IAC-2, uma das poucas cultivares disponíveis para o Cerrado à época e maior adaptação aos Cerrados. A estirpe CPAC 15 pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566, bastante competitiva, mas apresenta maior capacidade de FBN (Vargas et al., 1992; Peres et al., 1993; Hungria; Vargas, 2000; Hungria et al., 2006a). Essas duas estirpes passaram a ser utilizadas em inoculantes comerciais em 1992 e, passados 30 anos, compõem a grande maioria dos inoculantes utilizados na cultura, certamente sendo fortemente responsáveis pelo sucesso da FBN com a soja brasileira (Hungria et al., 2006a; Hungria; Mendes, 2015). Resultados de dezenas de ensaios compilados desde 1980 (Peres; Vidor, 1980; Peres et al., 1993; Hungria; Campo, 2005; Hungria et al., 2006a, 2007) comprovam a grande eficácia dessas quatro estirpes em todas as regiões produtoras de soja do Brasil e levaram à consolidação da prática de inoculação anual desde 1992 (Figura 2).

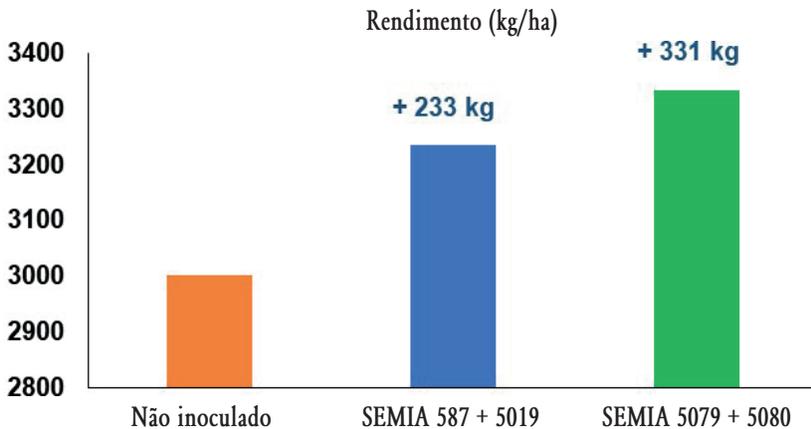


Figura 2. Rendimento médio de grãos obtido em 17 ensaios conduzidos entre 1988 e 2002 nas Regiões Sul e Centro-Oeste, comprovando a eficácia das quatro estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* para a cultura da soja e que levaram à consolidação da tecnologia de inoculação com essas estirpes.

Fonte: Adaptado de Hungria et al. (2006a).

Desenvolvimento da indústria de inoculantes e estabelecimento de legislação específica

A história da FBN no Brasil se mescla com a história da cultura da soja e do desenvolvimento de inoculantes (Santos et al., 2019). A necessidade de inocular a soja passou a demandar a produção de inoculantes para atender aos agricultores. Inicialmente, a produção ficou a cargo da Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, em 1949, usando ágar como veículo e, posteriormente, em 1955, em turfa. Em 1956, com o apoio dessa mesma secretaria, as atividades da primeira indústria nacional de inoculantes, a Leivas Leite, se iniciaram em Pelotas-RS. Desde então, o número de empresas produtoras e, posteriormente, importadoras de inoculantes cresceu substancialmente (Hungria; Campo, 2007; Araujo, 2017).

Sem dúvida pode-se afirmar que o sucesso da FBN com a cultura da soja no Brasil também reside na decisão de união de esforços da pesquisa, do setor produtivo privado e do legislativo, trabalhando juntos para garantir os benefícios pelo uso de inoculantes com qualidade e carregando as melhores estirpes identificadas pela pesquisa. Um marco histórico foi a criação, em maio de 1985, da primeira reunião da “Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium*”, denominada RELARE, reunindo a pesquisa, a indústria e o Ministério da Agricultura. Em reuniões que se realizam desde então, em geral bianualmente, foram estabelecidos critérios mínimos de qualidade dos inoculantes, protocolos de pesquisa e para controle de qualidade dos inoculantes, aspectos legais da comercialização, entre outros. A abrangência da RELARE passou a incluir outros microrganismos, resultando na ampliação do nome para “Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola” em 1998 (Hungria; Campo, 2007; Araujo, 2017). Por sua vez, a maioria das indústrias de inoculantes se uniu na Associação Nacional dos Produtores de Inoculantes (ANPI), criada em 1990, e também ampliada logo em seguida para incluir os importadores de inoculantes, passando à denominação de Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) (Araujo, 2017; ANPII, 2021).

O controle de qualidade dos inoculantes sempre foi uma preocupação dos pesquisadores que, em 1975, apresentaram uma demanda ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a fiscalização oficial dos inoculantes, na época à base de turfa, que deveria conter, no mínimo, 10^7 células/g de inoculante (Hungria; Campo, 2007). Desde então, o papel do legislativo tem sido fundamental para garantir a qualidade crescente dos produtos entregues aos agricultores. Em 16 de dezembro de 1980 foi promulgada a Lei Nº 6894, que “Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura”. Como na época somente eram comercializados inoculantes contendo rizóbios, inoculante foi definido como “material que contenha microrganismos fixadores de nitrogênio e que atue favoravelmente no desenvolvimento das plantas”. Essa lei também definiu a obrigatoriedade de registro de todos os produtos, bem como normas para a inspeção e a fiscalização. A Lei Nº 6894 recebeu uma emenda, tornando-se a Lei Nº 6934, publicada em 13 de julho de 1981 e confirmada em Decreto (Nº 4954 de 14 de janeiro de 2004), com a definição de inoculante como “produto que contém microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas” e na Instrução Normativa (IN) Nº 05, de 06 de agosto de 2004, com dois anexos: Anexo I - Definições e normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura; e Anexo II - Relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil (Hungria; Campo, 2017). A Lei Nº 6934 foi regulamentada pelo Decreto Nº 86955 de 18 de fevereiro de 1982, que passou a exigir a concentração de número superior a cem milhões (10^8) de células viáveis de rizóbios/g na indústria e a dez milhões (10^7)/g em inoculantes amostrados no comércio. Também foram estabelecidas multas para produtos comercializados em concentrações inferiores às exigidas. Por sua vez, a relação dos microrganismos foi atualizada na Instrução Normativa Nº 10, de 21 de março de 2006 (Hungria; Campo, 2017).

Norteados pelo princípio de que o sucesso dos microrganismos no campo depende, fundamentalmente, de boas estirpes que sejam fornecidas em produtos de boa qualidade, novos avanços foram introduzidos na

legislação, sempre com amplo respaldo de resultados obtidos pela pesquisa apresentados nas reuniões da RELARE. As atualizações mais recentes constam da Instrução Normativa Nº 13 de 24 de março de 2011, com descrição das especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura (Mapa, 2011). Na IN Nº 13 a concentração mínima de células viáveis de *Bradyrhizobium* em inoculantes é definida em 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC)/g ou mL, e que os mesmos devem ser isentos de contaminantes na diluição de 10^5 até a data do vencimento, bem como carregarem somente as estirpes autorizadas pelo Mapa e declaradas no registro/rótulo do inoculante. Para inoculantes com outras bactérias, que agora constam da lista de estirpes recomendadas, é definido que a concentração de células viáveis será a informada no processo de registro do produto, de acordo com a recomendação específica emitida por órgão brasileiro de pesquisa científica oficial ou credenciado pelo Mapa, mas continuam os limites para a presença de contaminantes, bem como a necessidade de confirmar a identidade das estirpes (Mapa, 2011). Todos os inoculantes devem ter validade de, no mínimo, seis meses. A IN Nº 13 também inclui uma atualização dos microrganismos, agora divididos em duas categorias. A primeira, com “microrganismos autorizados” (Anexo II da IN Nº 13), representados por rizóbios, amplamente respaldados por mais de um século de pesquisas e que dispensam testes de eficiência agrônômica para o registro. A segunda lista inclui “microrganismos recomendados” (Anexo III da IN Nº 13), com menor nível de informação científica em território nacional, exigindo testes de eficiência agrônômica para o seu registro; à medida que haja maior respaldo científico, esses microrganismos podem passar para o Anexo II (Mapa, 2011). Atualmente há alguns microrganismos “recomendados” com registro que ainda não estão incluídos no Anexo III da IN Nº 13, como *Pseudomonas fluorescens* e diversas espécies do gênero *Bacillus*.

Tão importante quanto definir critérios, é a necessidade de clareza dos métodos de avaliação da qualidade. Por anos os pesquisadores trabalharam e discutiram na RELARE protocolos para a análise de inoculantes e condução de ensaios de eficiência agrônômica. Após amplas discussões e trabalhos em grupos desde a IX RELARE, os protocolos foram aceitos em plenário na XIII RELARE de 2006 e publicados em 2007 (Campo; Hungria, 2007). Com base nesses protocolos, foram redigidas as instruções normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento descrevendo detalhadamente os métodos oficiais para análise de inoculantes, visando contagem, identificação e análise de pureza (Instrução Normativa Nº 30 de 12 de novembro de 2010). A seguir, foram publicados pelo Mapa, em 25 de março de 2011, como Anexos à Instrução Normativa Nº 13, “protocolos oficiais para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, produtos e tecnologias relacionadas a microrganismos promotores de crescimento, a bactérias associativas e ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas” (Mapa, 2010). Posteriormente, foi publicado um adendo, na Instrução Normativa Nº 14, de 13 de abril de 2018, permitindo a extração de DNA para identificação molecular dos microrganismos com kits comerciais e incluindo meio de cultura específico para contagem de *Azospirillum* spp. (Mapa, 2018). Todos esses protocolos detalhados, tanto da RELARE, como das instruções normativas estão disponíveis na internet em endereço incluído na lista de referências deste capítulo.

Certamente a combinação de germoplasma elite desenvolvido pela pesquisa, profissionalização do setor industrial de produção de inoculantes e estabelecimento de legislação garantindo que produtos de

qualidade cheguem ao agricultor formam o tripé que garante o sucesso da FBN e, mais recentemente, dos promotores de crescimento de plantas, com bons resultados no campo. Colhendo bons resultados, o agricultor adota a tecnologia, o que é confirmado pelo crescimento no consumo de inoculantes (Figura 3), em alta concordância com a produção nacional de soja, que cresceu muito mais do que a área cultivada, graças a incrementos na produtividade.

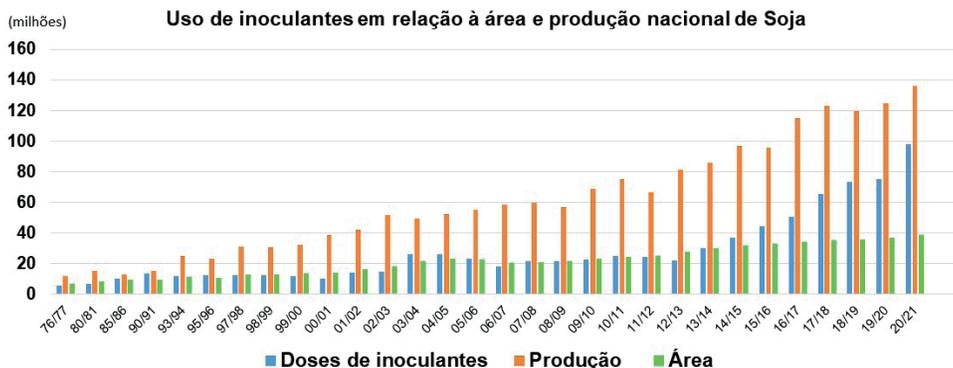


Figura 3. Expansão da comercialização de inoculantes (milhões de doses) em relação à produção de soja (milhões de toneladas) e área (milhões de hectares) cultivada com a cultura no Brasil.

Fonte: Figura construída a partir de dados disponibilizados em Hungria e Campo (2007); Hungria e Nogueira (2019); ANPII (2021); CONAB (2021a) e estimativas de mercado.

Do volume de doses de inoculantes comercializadas na safra 2020/2021, as estimativas são de que 87% são de *Bradyrhizobium* spp. para a cultura da soja e 12,4% de *Azospirillum brasilense*, dos quais mais de 80% também são destinados à soja, em coinoculação com *Bradyrhizobium* spp.

Ontogenia da FBN em soja

Em geral, em condições de campo, desde que haja condições adequadas para haver interação entre a soja e os rizóbios, entre cinco e oito dias após a emergência (DAE) é possível visualizar a formação dos primórdios nodulares. Ao redor de 10 a 12 DAE, caso a simbiose tenha sido bem sucedida, devem ser visualizados de 10 a 12 nódulos de 1 a 2 mm, na parte denominada como “coroa da raiz”, uma região de, aproximadamente, 5-10 cm abaixo dos cotilédones e com 5-10 cm de largura para cada lado (Figura 4A). Logo após a germinação, as plântulas utilizam o N das reservas dos cotilédones e é possível que elas terminem um pouco antes do processo de FBN estar completamente ativo, podendo haver um leve amarelecimento das plantas, mas que desaparece em um a dois dias após a FBN se tornar funcional. No complexo processo de nodulação, os segmentos radiculares são suscetíveis à formação de nódulos por apenas algumas horas durante o seu crescimento. Desse modo, caso um segmento da raiz não seja infectado pelo rizóbio naquele momento, nunca mais um nódulo será formado naquele sítio. Na quase totalidade dos casos, a nodulação na coroa principal está associada à inoculação das sementes com células de rizóbios em número suficiente e fisiologicamente ativas para a nodulação. Em “áreas novas”, ou seja, que não foram cultivadas com soja anteriormente ou há muitos anos, a população de rizóbios

compatíveis é nula ou baixa e não haverá nodulação. Mesmo em “áreas velhas” com populações elevadas devido à inoculação e cultivos anteriores com soja, a nodulação na coroa principal também é rara, visto que as bactérias do solo se encontram latentes e precisam ser reativadas por sinais moleculares da planta hospedeira para iniciar o processo de infecção das raízes. Isso resulta em atraso na nodulação e a formação típica de nódulos na coroa da raiz principal não ocorre (Figura 4B), quando comparada à inoculação com bactérias fisiologicamente prontas para a nodulação que estão presentes no inoculante e que são colocadas juntas às sementes (Figura 4A).

Ao analisar a raiz nodulada, é importante verificar, também, o tamanho dos nódulos, pois é desejável obter um maior número de nódulos com tamanho igual ou superior a 2 mm, que são os que apresentam maior capacidade de FBN. Após as duas primeiras semanas, as etapas de nodulação e de FBN são intensificadas até o florescimento, quando uma planta de soja bem nodulada deve apresentar entre 15 e 30 nódulos por planta. A partir do início do florescimento, com frequência observa-se uma formação secundária de nódulos (Figura 4C) e esses nódulos contribuem, substancialmente, para o fornecimento de N, de modo que as taxas de FBN continuam suficientemente altas para atender às necessidades da planta até o período de enchimento dos grãos. Essa nodulação, que ocorre nas raízes secundárias, em segmentos radiculares mais distantes da coroa da raiz, quase sempre resulta da infecção pelos rizóbios que já estão estabelecidos no solo, por inoculações realizadas em anos anteriores, visto que os rizóbios se locomovem lentamente no solo.

O período entre o início da FBN e o florescimento pleno corresponde às taxas mais elevadas de aporte de N para a cultura da soja (Figura 5). A soja pode, ainda, formar novos nódulos em resposta à inoculação suplementar em estádios de crescimento vegetativo até R1 (início do florescimento), incrementando a contribuição da FBN e o rendimento de grãos, podendo representar uma estratégia interessante para incrementar o aporte de N para as plantas em fases mais avançadas do seu ciclo e que resulte em ganhos de produtividade (Moretti et al., 2018).

No período final de enchimento de grãos os nódulos começam a senescer. Com a leghemoglobina perdendo sua função, observa-se alteração da coloração interna dos nódulos para tons esverdeados ou marrons. A partir desse estágio, o processo preferencial passa a ser o da remobilização de N das folhas, que estava armazenado principalmente na forma de RuBisCo, a enzima mais abundante nas plantas, para as vagens, razão pela qual ocorre o amarelecimento e a senescência das folhas, com início pelas folhas mais velhas do baixeiro, etapa natural e que não deve ser vista com preocupação pelos agricultores. Muito importante destacar que há vários estudos indicando que o N da FBN é mais eficientemente translocado para os grãos do que o N proveniente dos fertilizantes (Neves; Hungria, 1987). Fornecer alguma fonte de N mineral na época em que ocorre a remobilização de N das folhas para as vagens somente implicará no acúmulo de N nas folhas atrasando a senescência das mesmas o que, inclusive, pode dificultar a colheita.

Uma questão frequentemente levantada é se cultivares de tipo de crescimento indeterminado têm maior capacidade de realizar FBN em relação às de crescimento determinado. Pesquisas indicam uma alta sincronia entre a fotossíntese e a FBN, na teoria fonte/dreno, em que maiores taxas fotossintéticas demandariam maiores taxas de FBN (Kaschuk et al., 2010; de Luca et al., 2014). Estudos conduzidos até o momento no Brasil comparando cultivares de tipo de crescimento determinado e indeterminado

(A) Nodulação abundante na coroa principal da raiz, indicando alta eficiência do inoculante



(B) Atraso na nodulação, com falha na coroa principal, com nódulos nas raízes secundárias



(C) Nodulação secundária, ocorrida após o florescimento

Fotos: Mariângela Hungria (A e B) e Marco Antonio Nogueira (C)

Figura 4. Três tipos de padrões de nodulação que podem ser encontrados em raízes de soja.

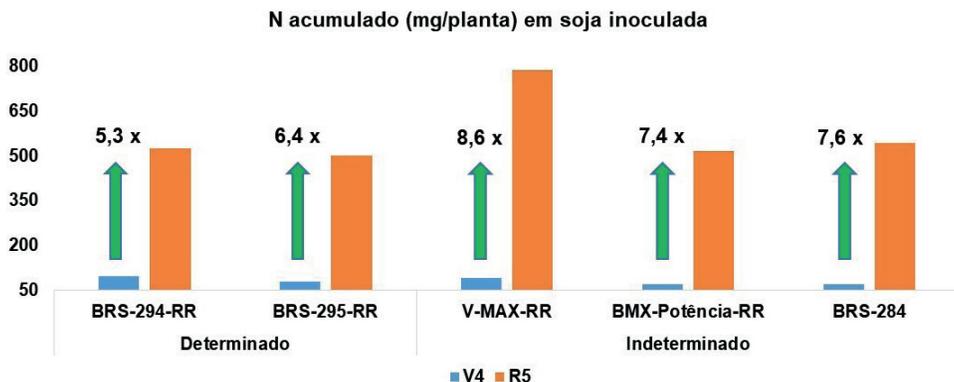


Figura 5. N acumulado na parte aérea em V4 (estádio vegetativo, terceira folha trifoliada completamente desenvolvida) e em R2 (florescimento pleno) em cultivares de soja de tipo de crescimento determinado e indeterminado inoculadas e sem receber N mineral, indicando grande aporte de N proveniente do processo biológico nesse período. Ensaio conduzido na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, PR. Os dados representam médias de seis repetições.

Fonte: Figura construída a partir de dados disponibilizados em Kaschuk et al. (2016).

indicam que, em geral, ambas são eficientes no processo de FBN (Kaschuk et al., 2016; Saturno et al., 2017) (Figura 5). Vale salientar que a confirmação da teoria fonte:dreno, fotossíntese:FBN em soja nodulada no Brasil (Kaschuk et al., 2010; de Luca et al., 2014) é de grande relevância, pois indica que, enquanto houver fotossíntese, o processo de FBN continuará a suprir N para a planta. De fato, em avaliações durante todo o ciclo (120 dias) da cultivar Embrapa 48, Zotarelli et al. (1999) verificaram contribuição da FBN até o final do ciclo.

O eterno dilema sobre o uso de fertilizante nitrogenado na cultura da soja

Certamente tão antiga quanto a história da FBN com a soja no Brasil, são as dúvidas que surgem quanto à necessidade de complementação das exigências nutricionais da cultura com fertilizantes nitrogenados. Nas décadas de 1970 e 1980 imperava o conceito de uma dose de arranque, ou “dose starter”. Conforme já comentado, a nodulação e o estabelecimento da FBN requerem uma série de etapas complexas que iniciam com a troca de sinais moleculares entre os simbiosites e, pela complexidade, é possível que as reservas de N dos cotilédones terminem um pouco antes de o processo estar ativo, mas as plantas se restabelecem rapidamente da limitação momentânea, conforme comentado no item de ontogenia da FBN em soja. Esses sintomas visuais, mais frequentes quando as condições ambientais na semeadura são estressantes, como no plantio convencional, levou à disseminação equivocada da ideia da necessidade de adubação com até 40 kg/ha de N na semeadura. Contudo, a adubação com fertilizante nitrogenado é antagônica à FBN e a aplicação, nesse estágio de desenvolvimento da planta é crítica, por inibir a infecção das raízes pelos rizóbios no período mais propício para a formação de nódulos. Visando avaliar a necessidade dessa dose inicial de fertilizante, foram conduzidos vários ensaios a campo, particularmente nas décadas de 1980 e 1990, que confirmaram não haver qualquer benefício no rendimento de grãos pela aplicação de 10, 20, 30 ou 40 kg/ha de N na semeadura, nos sistemas de plantio convencional ou direto, na Região Sul e nos Cerrados (Hungria et al., 1994, 1997, 2006b, 2007).

Outra dúvida surgiu sobre a necessidade de suplementação com fertilizantes nitrogenados em estádios reprodutivos da planta, assumindo que a FBN cairia drasticamente após o florescimento. Contudo, isso não foi confirmado para os genótipos brasileiros. Como exemplo, em 40 experimentos conduzidos em Londrina e Ponta Grossa, PR, a aplicação de fertilizante nitrogenado em R2 (florescimento pleno) ou R4 (vagem completamente desenvolvida) prejudicou a atividade dos nódulos que ainda estavam ativos, diminuindo a contribuição da FBN e prejudicando o rendimento de grãos da soja, tanto no sistema plantio direto como no convencional (Hungria et al., 2006b).

Outra demanda por respostas veio em 2013/2014 pelo CESB (Comitê Estratégico Soja Brasil) quanto ao efeito da aplicação de ureia em R5.3 (maioria das vagens entre 25 e 50% de granação máxima), em cobertura ou via foliar. Com base nos resultados de 51 ensaios conduzidos por 16 instituições públicas e privadas em nove estados brasileiros foi concluído que a pesquisa descartava ganhos no uso de adubação nitrogenada no cultivo da soja (Agrolink, 2014). Nesse desafio do CESB, nos ensaios conduzidos pela Embrapa Soja em Ponta Grossa, com uma cultivar de crescimento determinado e outra de crescimento indeterminado, foram obtidos rendimentos de 4.500 a 4.800 kg/ha, sem nenhuma resposta à aplicação de N em cobertura ou via foliar (Saturno et al., 2017).

Considerando apenas os ensaios conduzidos pela Embrapa Soja, mais de 300 nos últimos 30 anos, conclui-se que não há qualquer benefício ou necessidade de suplementação da soja com fertilizantes nitrogenados, caso tenham sido utilizadas boas práticas de inoculação. As avaliações incluem comparações em sistema de plantio direto ou convencional, cultivares precoces ou tardias, convencionais ou transgênicas, de tipo de crescimento determinado ou indeterminado, com fertilizantes nitrogenados aplicados em todos os estádios de crescimento da soja, com diferentes fontes, a lanço, em sulco ou foliar (Hungria et al., 1997, 2006b, 2007; Kaschuk et al., 2016; Saturno et al., 2017; Hungria; Nogueira, 2019). Situações em que há resposta à adubação nitrogenada evidenciam algum fator limitante à FBN, inclusive ausência de boas práticas de inoculação. Conseguir altos rendimentos sem necessidade de complementação com fertilizantes nitrogenados resulta de décadas de investimento em pesquisas e desenvolvimento tecnológico com a cultura. Como exemplo, nos EUA, onde não houve interesse na pesquisa em FBN nas últimas décadas, pois o custo dos fertilizantes nitrogenados não é limitante, têm-se genótipos de plantas e de microrganismos pouco eficientes no processo de FBN, sendo frequentes os relatos de respostas à aplicação de N (Ortez et al., 2019; La Menza et al., 2020).

A importância da inoculação anual da soja

Algumas pesquisas conduzidas com a soja, particularmente nas décadas de 1980 e 1990 nos EUA levaram ao conceito de que, em solos previamente cultivados com soja e que já haviam recebido inoculantes, não seria possível introduzir novas estirpes, ou obter respostas à uma nova inoculação no início de cada safra, dada a impossibilidade de competir com a população estabelecida no solo, ainda que fosse tão baixa quanto 10 células viáveis/g de solo. Essa premissa era aceita no Brasil pois, de fato, em qualquer área de soja que já havia recebido inoculantes anteriormente, sempre era verificada boa nodulação e não se constataavam sintomas de deficiência de N. Essa persistência de rizóbios nodulantes de soja no solo se deve, mais uma vez, à pesquisa brasileira, que sempre preconizou o uso de estirpes competitivas e com alta capacidade de FBN.

Na safra 1992/1993, porém, a Embrapa Soja iniciou uma série de pesquisas para verificar se, de fato, não havia respostas à inoculação anual da soja, mesmo em solos com populações elevadas introduzidas por inoculações anteriores, que chegavam a 1 milhão de células viáveis/g de solo. A análise dos resultados obtidos nos primeiros cinco anos de pesquisa, em ensaios conduzidos nos Cerrados e na Região Sul, indicou incrementos significativos pela inoculação anual (também denominada reinoculação), em média de 4,5% no rendimento de grãos e de 9% no teor de N nos grãos (Hungria et al., 1997). As pesquisas prosseguiram e, em 2006, considerando 29 ensaios, foi constatado incremento médio no rendimento de grãos de 8% (Hungria et al., 2006a). Em geral, maiores respostas à inoculação anual são observadas na Região Centro-Oeste do que na Região Sul, indicando que a inoculação anual é ainda mais relevante sob condições mais sujeitas a estresses edafoclimáticos. Incrementos importantes no teor de N dos grãos também foram confirmados na análise de 13 ensaios, em média de 8,1% na Região Centro-Oeste e de 4,3% na Região Sul (Hungria et al., 2006a). Os benefícios da inoculação anual são relacionados, principalmente, à nodulação inicial e eficiente na coroa da raiz principal (Figura 4A), passando a contribuir com maiores taxas de FBN na fase inicial de crescimento das plantas, que é crítica para garantir bom desempenho até

o final do ciclo. Embora em alguns casos possam não ser constatadas diferenças estatísticas no número e massa de nódulos das plantas, a inoculação anual permite maior atividade da FBN, resultando em ganhos importantes no rendimento e N total dos grãos, enquanto que a aplicação de N-fertilizante resulta em inibição da nodulação sem incrementar esses parâmetros, conforme pode ser visualizado em um ensaio conduzido no Tocantins (Figura 6). Esse resultado pode ser consequência de uma ocupação nodular mais rápida pelas bactérias fisiologicamente mais ativas provenientes do inoculante. Segundo levantamento realizado pela ANPPII, na safra 2019/2020 a inoculação da soja foi praticada em 79% da área cultivada no país, com grande percentagem de “áreas velhas”, confirmando a confiança dos agricultores na tecnologia de inoculação anual da soja.

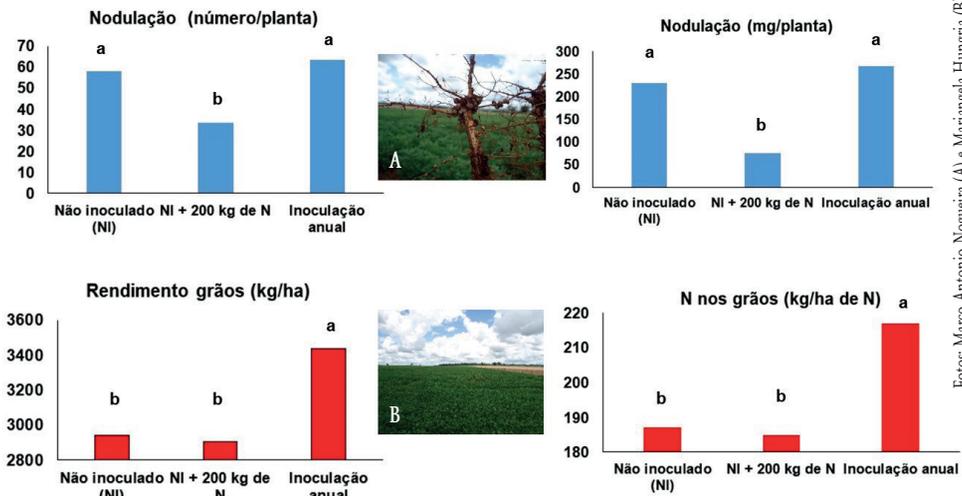


Figura 6. Nodulação avaliada em V5 (quarta folha trifoliada completamente desenvolvida) e rendimento e N total acumulado nos grãos na maturidade fisiológica de soja, cultivar BRS 8980 IPRO, em ensaio conduzido em Aparecida do Rio Negro-TO, em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* estimada em $4,6 \times 10^5$ células viáveis/g. Os tratamentos corresponderam aos controles não inoculados, sem ou com o aporte de 200 kg/ha de N (100 kg na semente e 100 kg em R1-início do florescimento) e inoculação anual com uma formulação líquida desenvolvida em parceria público-privada com a Embrapa Soja, aportando 1,2 milhões de células/semente. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidos pela mesma letra, para cada parâmetro, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$, Duncan).

Fonte: Figura construída a partir de dados disponibilizados em Hungria et al. (2020).

Coinoculação da soja

Os resultados positivos obtidos com a inoculação anual da soja levaram os agricultores a se interessarem e demandarem outros produtos biológicos (Hungria; Nogueira, 2019). A pesquisa então selecionou estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho e do trigo (Hungria et al., 2010). O primeiro produto comercial foi lançado em 2009, e duas das estirpes identificadas (Hungria et al., 2010) passaram a ser largamente utilizadas, a Ab-V5 (=CNPSo 2083) e a Ab-V6 (=CNPSo 2084). Em

uma década de pesquisas os benefícios obtidos pela inoculação dessas culturas, em todos os patamares de produção, foram amplamente confirmados, representando um dos casos mais bem-sucedidos de produto biológico desenvolvido e de adoção por agricultores no Brasil (Santos et al., 2021; Barbosa et al., 2022).

O *Bradyrhizobium* da soja e todos os demais rizóbios em simbiose com leguminosas representam a interação com maior grau de coevolução de simbiontes, com alta especialização no processo de FBN e podendo suprir todas as necessidades de N pela planta hospedeira (Ormeño-Orrillo et al., 2013). Já com o *A. brasilense*, que também possui a habilidade de fixar nitrogênio atmosférico, a associação com as plantas ocorre na rizosfera e é menos especializada, conseguindo suprir apenas uma pequena parte das necessidades da planta. Por outro lado, as estirpes de *A. brasilense* selecionadas no Brasil se destacam como fortes produtoras de fitormônios, particularmente ácido indolacético (AIA), com grande capacidade de promoção de crescimento das raízes, incrementando a absorção de água e nutrientes pelas plantas e resultando em melhorias nos aspectos nutricionais e de tolerância a estresse hídrico (Santos et al., 2021).

Mais uma vez, com o sucesso agrônômico verificado com o uso de *A. brasilense* em gramíneas (Santos et al., 2021), os agricultores passaram a relatar incrementos no rendimento da soja que era cultivada em sucessão a essas gramíneas inoculadas com *A. brasilense*. Isso despertou a pesquisa a investigar benefícios residuais, sendo verificado que os processos microbianos do *Bradyrhizobium* spp. e do *A. brasilense* eram distintos e complementares e que os dois microrganismos eram compatíveis, abrindo uma excelente oportunidade para o uso combinado dos mesmos em coinoculação. Estudos em laboratório, casa de vegetação e a campo foram conduzidos e indicaram que, em “áreas velhas”, a inoculação anual resultava em incremento médio no rendimento de grãos de soja de 3,7 sacas/ha ou 8,4%, incrementando para 7,1 sacas/ha ou 16,1% com a coinoculação (Hungria et al., 2013). Incrementos foram observados quando o *Bradyrhizobium* spp. foi inoculado nas sementes e o *A. brasilense* foi aplicado no sulco de semeadura (Hungria et al., 2013), quando ambos foram aplicados nas sementes (Hungria et al., 2015), ou quando ambos foram aplicados no sulco de semeadura (Tabela 2). Cabe comentar que, pela grande capacidade de síntese de AIA pelas estirpes de *A. brasilense* selecionadas, e pelas implicações fisiológicas relacionadas aos fitormônios, aplicações excessivas podem inibir o crescimento das plantas; consequentemente, a dose recomendada é de apenas uma via sementes ou de duas via sulco de semeadura, enquanto que para *Bradyrhizobium* spp. podem ser utilizadas mais doses. A maior tolerância a períodos moderados de seca pela coinoculação também foi confirmada em ensaio a campo com soja coinoculada (Cerezini et al., 2016).

O primeiro produto comercial com registro para coinoculação da soja foi obtido em 2013 (Hungria et al., 2013) e despertou o interesse da comunidade científica. Em 2021, uma meta-análise baseada em 51 publicações científicas com dados de 39 ensaios a campo confirmou estatisticamente os benefícios da coinoculação, com incrementos médios de 11% na massa de raízes, de 5,4% no número e de 10,6% na massa de nódulos e de 3,6% no rendimento de grãos e de 3,2% no teor de N nos grãos, em comparação com a inoculação exclusivamente com *Bradyrhizobium* spp. (Barbosa et al., 2021).

No âmbito de unidades de referência técnica (URT), um programa de difusão da tecnologia aos agricultores foi estabelecido entre a Embrapa Soja e o Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), agora Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná). Os dados já consolidados de três safras indicam que foram atendidos 2.226 agricultores, em 130 municípios do

Tabela 2. Ganhos médios no rendimento de grãos de soja pela inoculação anual com *Bradyrhizobium* spp. e pela coinoculação com *Azospirillum brasilense*. Experimentos conduzidos pela Embrapa Soja, em “áreas velhas” com população de rizóbios nodulantes de soja mínima no solo de 10^4 células viáveis/g, com seis repetições. Todos os ganhos foram estatisticamente significativos (Duncan, $p < 0,05$) em relação ao controle não inoculado.

Tratamento	Ganhos médios
Inoculação anual com <i>Bradyrhizobium</i> spp. nas sementes (BSem) ¹	+ 222 kg/ha (+ 8,4%)
Inoculação anual (Bsem) + <i>Azospirillum brasilense</i> no sulco ¹	+ 427 kg/ha (+ 16,1%)
Inoculação anual (BSem)+ <i>A. brasilense</i> nas sementes ²	+ 358 kg/ha (+ 12,8%)
Inoculação anual com <i>Bradyrhizobium</i> spp. no sulco + <i>A. brasilense</i> no sulco ³	+ 405 kg/ha (+ 15,1%)

Fonte: ¹Adaptado de Hungria et al. (2013); ²Adaptado de Hungria et al. (2015); ³Ensaio conduzido pela Embrapa Soja. Compilação realizada por Hungria e Nogueira (2019).

Paraná, nos quais foram estabelecidas 169 URT. Resultados positivos pela coinoculação foram observados em mais de 95% das URT, com ganho médio de 288 kg/ha e benefício econômico de R\$ 345/ha, confirmando o sucesso da tecnologia (Nogueira et al., 2018; Prando et al., 2019, 2020). Em outro estudo em solo dos Cerrados, avaliações com as cultivares Potência e Valiosa resultaram em rendimentos médios de 4.868 e 5.413 kg/ha sem e com coinoculação com *A. brasilense*, respectivamente, um incremento de 545 kg/ha e lucro operacional de R\$ 540/ha (Galindo et al., 2018). Segundo levantamento realizado para a ANPIL, em apenas cinco anos de lançamento a coinoculação já era praticada em 25% da área cultivada com soja no país.

Desafios para garantir o sucesso da FBN na cultura da soja

Existem desafios que precisam ser vencidos para garantir que a história de sucesso da FBN com a soja brasileira tenha continuidade. A nutrição adequada das plantas se torna mais importante do que nunca. Uma planta em simbiose é mais exigente em nutrientes do que outra recebendo N mineral, pois precisa atender às suas demandas, bem como às da bactéria e da simbiose. Alguns nutrientes são particularmente críticos para o desempenho adequado da simbiose. O molibdênio (Mo), por exemplo, é componente da enzima nitrogenase, de modo que a sua deficiência implicará em colapso do processo biológico, razão pela qual induz a sintomas de deficiência de N. O cobalto (Co) participa da formação da cobalamina, precursora da leghemoglobina, cuja importância já foi discutida. Consequentemente, recomenda-se o fornecimento de 2 a 3 g/ha de Co e de 12 a 25 g/ha de Mo via tratamento de sementes ou via foliar entre os estágios V3-V5 (segunda e quarta folhas trifoliadas completamente desenvolvidas) (Seixas et al., 2020). Todos os demais macro e micronutrientes podem limitar as plantas em simbiose, pois desempenham papéis essenciais, por exemplo, o cálcio (Ca) no crescimento das raízes e nódulos, o fósforo (P) no fornecimento de energia para o processo de FBN, etc. Consequentemente, a deficiência de qualquer nutriente implicará em limitação no processo de FBN. Conclui-se que, embora a FBN seja uma tecnologia de baixo custo, ela exige alto conhecimento tecnológico.

Os efeitos deletérios do contato de agrotóxicos e outros insumos químicos no tratamento de sementes sobre a sobrevivência de rizóbios são relatados há décadas (Hungria et al., 2007; Campo et al., 2009; Hungria; Mendes, 2015; Hungria; Nogueira, 2019) e o número de moléculas e formulações utilizadas

para este fim cresce a cada ano. Foram realizadas várias tentativas de compatibilização entre biológicos e químicos utilizados no tratamento de sementes, principalmente fungicidas e inseticidas, com resultados não satisfatórios (Hungria et al., 2007; Campo et al., 2009). O cenário pode ser ainda mais limitante quando são utilizadas sementes pré-inoculadas, também denominada inoculação antecipada, em que o contato das bactérias com os agrotóxicos ocorre por períodos prolongados. Pode haver também incompatibilidade com outros químicos, como micronutrientes e suas diferentes formulações. Atualmente, uma grande variedade de combinações de químicos é utilizada no tratamento de sementes, muitas das quais com consequências desconhecidas sobre a sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* quando aplicados juntos nas sementes. Análises realizadas na Embrapa Soja indicam que, em geral, o máximo período de inoculação antecipada com tratamento químico de sementes, ainda que armazenadas em condições ótimas, raramente é superior a uma semana, garantindo a concentração mínima desejável de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. no momento da semeadura, preconizada pela pesquisa entre 80.000 e 100.000 células por semente. No caso dos micronutrientes Co e Mo, para aliviar o impacto dos químicos sobre as bactérias nas sementes, estudos indicaram que estes micronutrientes podem ser aplicados via foliar, nas mesmas doses recomendadas via sementes, nos estádios de desenvolvimento V3-V5 (Seixas et al., 2020). Outra estratégia para evitar o problema de incompatibilidade entre o inoculante e os agrotóxicos e outros insumos químicos nas sementes consiste na inoculação via sulco de semeadura, o que evita o contato direto das bactérias com os produtos químicos (Campo et al., 2010). Nesse caso, a dose de *Bradyrhizobium* spp. deverá ser aumentada para pelo menos 2,5-3 doses/ha, enquanto que a de *A. brasilense* ficará restrita a 2 doses/ha. A adoção da inoculação no sulco de semeadura vem crescendo a cada ano, estimando-se que já seja adotada em cerca de 20% da área cultivada com soja no Brasil.

Estresses ambientais, como temperaturas elevadas e baixa umidade do solo, os de maior ocorrência nos trópicos, sempre foram reconhecidos como os que mais frequentemente limitam a FBN (Hungria; Vargas, 2000; Dwivedi et al., 2015). Estratégias como a adoção do sistema plantio direto, que diminui as oscilações de temperatura e umidade do solo e a coinoculação com *A. brasilense*, que aumenta o volume radicular e o aproveitamento da água disponível, auxiliam na mitigação desses estresses (Hungria; Vargas, 2000; Cerezini et al., 2016; Hungria; Nogueira, 2019). Contudo, os desafios frente às mudanças climáticas globais são cada vez maiores, dada a sensibilidade da simbiose a esses estresses abióticos.

O desenvolvimento industrial tem sido fundamental para o sucesso da FBN com a cultura da soja no Brasil, com enormes avanços na qualidade dos inoculantes oferecidos aos agricultores. Como exemplo, das 7.000 células/semente citadas por Freire e Vidor (1981) como dose “normal” para inoculantes para a soja, ensaios conduzidos a campo chegaram à recomendação atual, de no mínimo 1,2 milhões de células viáveis a serem inoculadas por semente (Hungria et al., 2017), ou 2,5 milhões de células/semente via sulco de semeadura (Campo et al., 2010), que só podem ser garantidos por inoculantes de qualidade, com alta concentração de células e isentos de contaminantes (Hungria; Campo, 2007). Certamente, sem o desenvolvimento industrial que permite que inoculantes de qualidade cheguem até os agricultores, os benefícios da FBN não seriam verificados. Produzir inoculantes de alta qualidade exige profundos conhecimentos em microbiologia, biotecnologia e bioprocessos. Retrocessos são altamente prováveis caso a produção de inoculantes passe a ser realizada nas propriedades, conhecida como produção *on farm*,

ou produção caseira, em que todas as técnicas para se obter inoculante de alta qualidade em termos de concentração celular, ausência de contaminantes e garantia da presença do microrganismo de interesse não são totalmente aplicadas. Em análises realizadas em amostras de inoculantes produzidos *on farm* com o objetivo de multiplicar *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense*, os resultados foram alarmantes. Além de os microrganismos alvo não estarem presentes nas amostras foi observada alta contaminação com microrganismos não alvo, muito dos quais com alto potencial patogênico para plantas, animais e humanos, inclusive com resistência a antibióticos (Bocatti et al., 2022). Com isso, pode haver um grande retrocesso em todos os avanços conseguidos na tecnologia de FBN no Brasil no último século (Figura 7).

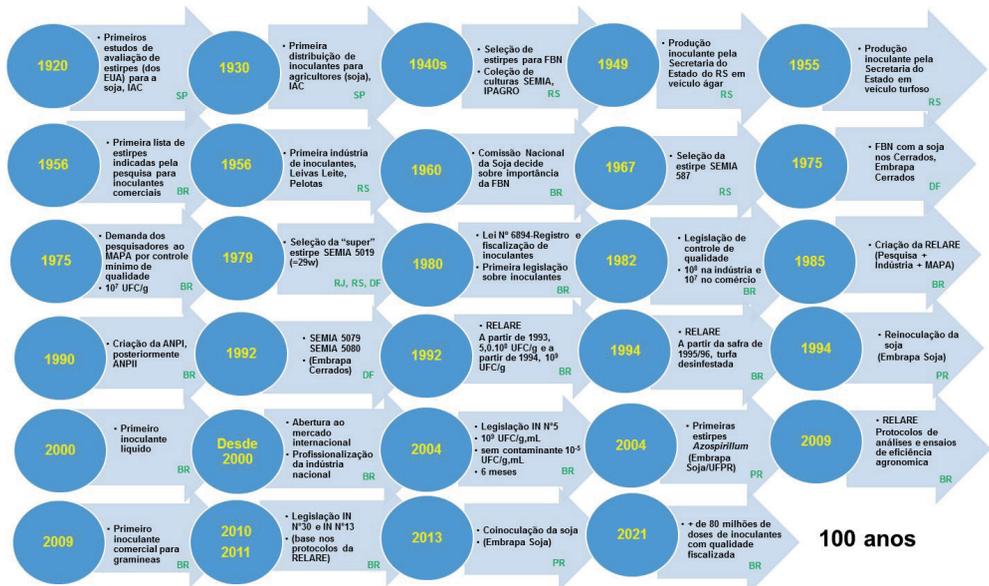


Figura 7. Linha do tempo dos principais eventos relacionados à pesquisa com fixação biológica do nitrogênio, produção de inoculantes e marcos legislativos no Brasil.

Boas práticas de inoculação

Os progressos conseguidos pela pesquisa e o incremento na qualidade dos inoculantes não promoverão os incrementos esperados no campo caso não sejam adotadas boas práticas de inoculação. Os principais pontos a serem considerados são: 1) Verificar se o produto tem registro no Mapa para a finalidade desejada, se está dentro do prazo de validade, se foi transportado e armazenado em condições adequadas (protegido do sol, em temperaturas abaixo de 30 °C e ambiente ventilado); cuidados com temperaturas elevadas devem continuar durante a semeadura; 2) Seguir a recomendação técnica do produto registrado, confirmando se segue a recomendação técnica da pesquisa; 3) No caso de inoculante turfoso, usar solução açucarada a 10% para aderência às sementes e, no caso do inoculante líquido, além de utilizar a dose adequada para fornecer a concentração teórica mínima de células por semente (1,2 milhões), não utilizar volume inferior a 100 mL/50 kg, garantindo a distribuição homogênea nas sementes; 4) O volume total

de líquidos adicionados às sementes, considerando inoculantes, agrotóxicos e outros insumos químicos, não deve ultrapassar 300 mL/50 kg; no caso de sementes com alta qualidade fisiológica (alta germinação e, principalmente, alto vigor), podem ser aplicados até 550 mL/50 kg; 5) Caso seja necessário o tratamento de sementes com agrotóxicos e outros produtos químicos, esses devem ser aplicados primeiro, deixar secar e aplicar o inoculante em uma segunda operação; 6) A inoculação pode ser feita em tambor rotatório, betoneira ou em máquinas específicas para o tratamento de sementes; o procedimento deve ser feito à sombra, deixando 20-30 minutos para secagem. Os inoculantes não devem ser aplicados diretamente na caixa semeadora e nunca devem ser misturados com os agrotóxicos e outros insumos químicos, no popular “sopão”; 7) Maior sucesso é obtido quando é fornecida alta concentração de células e a semeadura é realizada no mesmo dia da inoculação, especialmente se a semente for tratada com agrotóxicos e outros produtos químicos; em caso de dúvida quanto à sobrevivência das bactérias, repetir a operação de inoculação; 8) Para *Bradyrhizobium* spp. não há limitação para o número de doses a serem aplicadas, salvo o volume de líquido tolerado pelas sementes; contudo, para outros microrganismos, verificar os resultados das pesquisas quanto à compatibilidade com *Bradyrhizobium* spp. e a recomendação do fabricante; 9) Evitar semear em condições estressantes, como a semeadura “no pó”, pois além de prejudicar a sobrevivência das bactérias inoculadas, também prejudica o vigor das sementes; 10) A inoculação no sulco é uma tecnologia consolidada que pode ser utilizada para evitar o contato da bactéria com agroquímicos ou biológicos incompatíveis nas sementes, mas deve ser aplicada, no mínimo, uma dose equivalente a 2,5 milhões de células/semente; 11) No caso de sementes pré-inoculadas devem ser garantidas no mínimo 80 mil a 100 mil células viáveis/semente no momento da semeadura; 12) Métodos alternativos de inoculação das sementes, como pulverização na superfície do solo ou foliar, devem ser adotados somente em caso de emergência, de forma complementar, em caso de falha da nodulação, mas não substituem a aplicação via sementes ou sulco de semeadura; nesse caso, a aplicação deve ser feita com solo úmido e no final da tarde; 13) Todas as outras recomendações de boas práticas para a cultura, como nutrição, práticas culturais, devem ser seguidas rigorosamente, para garantir o sucesso da FBN.

Benefícios econômicos e ambientais da FBN

Com frequência são divulgados números indicando o quanto a FBN com a soja representa em termos econômicos e ambientais para o Brasil. Essas estimativas são importantes para valorizar o investimento em pesquisa, como ferramenta para indicar sustentabilidade agrícola e com potencial de uso em negociações como créditos de carbono. Uma breve explicação sobre os cálculos foi dada por Hungria e Mendes (2015). O roteiro dos cálculos que resultam nos números divulgados pela Embrapa Soja é exposto a seguir, permitindo a atualização a cada safra e pode servir como modelo para estimativas com outras culturas e microrganismos.

Em média, para cada 1.000 kg de grãos de soja são necessários 78 kg de N, dos quais 54 kg são exportados pelos grãos e 24 kg permanecem nos restos culturais (Seixas et al., 2020). Considerando a produtividade média nacional de 3.529 kg/ha na safra 2020/21 (Conab, 2021a), a demanda de N seria de 275 kg/ha. Os solos brasileiros raramente fornecem mais de 20 kg/ha de N por safra, reduzindo essa necessidade para 255 kg/ha de N. A eficiência do uso do fertilizante nitrogenado pelas plantas é baixa,

estimada em 30 a 50% (Reetz Jr., 2016) e de 45 a 60,7% (Lara-Cabezas; Pádua, 2007), este último em estudo realizado no Brasil. Assumindo um valor de eficiência de 50%, chega-se à estimativa de uma demanda de 510 kg/ha de N, para que os 255 kg/ha sejam aproveitados pela planta. Considerando-se a taxa de câmbio de US\$ 1 = R\$ 5,4759 em janeiro de 2021, com um custo de US\$ 0,91 por kg de N (janeiro de 2021) para a ureia, a principal fonte de N utilizada no país (CONAB, 2021b), o custo do N-fertilizante necessário para a cultura da soja seria de US\$ 462/ha. Em comparação, considerando-se os preços em 2020, o custo médio do inoculante seria de US\$ 0,86/ha (Conab, 2021b). Portanto, nos 38,526 milhões de ha cultivados com soja em 2020/2021 (Conab, 2021a), tem-se a extraordinária economia de US\$ 17,88 bilhões. Cabe comentar que o ano de 2021 apresentou grande oscilação na taxa de câmbio. Para esses cálculos, foi utilizada a cotação de janeiro de 2021; contudo, em julho, em alguns estados o preço da ureia já era até 80% superior ao de janeiro (Conab, 2021b). Em relação ao impacto ambiental, as estimativas médias do IPCC (2006) indicam que 1 kg de N-fertilizante corresponde à emissão de, aproximadamente, 10,5 kg de equivalentes de CO₂, dos quais 4,5 kg são relacionados à síntese e cerca de 6 kg ao transporte, à aplicação e às perdas como N₂O. Com base nesses números, a FBN com a cultura da soja evitou, na safra 2020/2021, a emissão de 206 milhões de toneladas de equivalentes de CO₂ para a atmosfera pelo não uso de N-fertilizantes. Além disso, a FBN diminuiu o impacto causado pela lixiviação de nitrato proveniente dos fertilizantes, grande fonte de poluição da água (Coskun et al., 2017). Esses benefícios econômicos e ambientais resultam em ganhos sociais, melhorando não só a qualidade de vida dos agricultores, mas também de toda a sociedade.

Considerações finais

As pesquisas, validações e desenvolvimento tecnológico com a FBN na cultura da soja completaram mais de 100 anos no Brasil (Figura 7). O país é, atualmente, o líder mundial em contribuição da FBN na agricultura, liderança que foi conquistada com a cultura da soja. Essa posição de destaque foi conseguida com muito trabalho e união entre a pesquisa, o setor privado e o legislativo, tripé que é e deve continuar a ser responsável pela continuidade dessa história de sucesso. O enfraquecimento em qualquer um desses três pilares pode levar à perda de todos os benefícios conseguidos com tantos esforços. Um retorno à sociedade e ao meio ambiente estimado em mais de US\$ 17 bilhões e mitigação de mais de 200 milhões de toneladas de equivalentes de CO₂ representa um modelo de sustentabilidade agrícola no Brasil. Essa história de sucesso somente terá continuidade com o aporte de recursos para a pesquisa pública, a melhoria contínua de qualidade dos inoculantes e o respaldo legislativo garantido que o agricultor colherá em sua propriedade os resultados da pesquisa e dos avanços em bioprocessos.

Agradecimentos

Os pesquisadores da Embrapa Soja são bolsistas de pesquisa do CNPq e membros do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) “Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental”, MPCPAgro (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI 043/2019, CAPES).

Referências

- AGROLINK. CESB: pesquisa descarta ganho no uso de adubação nitrogenada no cultivo da soja. 2014. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/cesb-pesquisa-descarta-ganho-no-uso-de-adubacao-nitrogenada-no-cultivo-da-soja_190048.html>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- ANPII. Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/>>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- ARAUJO, S. C. *Caminhos, escolhas e conquistas*. s.l.: ANPII, 2017. 138 p.
- ARRESE-IGOR, C.; HUNGRIA, M.; BONILLA, I. Fixação biológica do nitrogênio. In: MARTINEZ, H. E. P.; LUCENA, J. J.; BONILLA, I. (Eds.). **Relações solo-planta**: bases para a nutrição e produção vegetal. Viçosa: Ed. UFV, 2021. p. 107-127.
- BARBOSA, J. Z.; HUNGRIA, M.; SENA, J. V. S.; POGGERE, G.; REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.103913
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. A.; HUNGRIA, M. CORRÊA, R. S.; MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, 2022. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104276
- BOCATTI, C. R.; FERREIRA, E.; RIBEIRO, R. A.; CHUEIRE, L. M. O.; DELAMUTA, J. R. M.; KOBAYASHI, R. K. T.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced "on farm" reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 267-280, 2022. DOI: 10.1007/s42770-021-00649-2
- CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. (orgs.). In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA, 13, Londrina, 2006. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212 p. (Embrapa Soja. Documentos, 290).
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009. DOI: 10.1007/BF03179994
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1103-1112, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000400010
- CEREZINI, P.; KUWANO, B.; SANTOS, M.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p.1 60-167, 2016. DOI: 10.1016/j.fcr.2016.06.017
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries históricas** - soja. 2021a. Disponível em: www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/item/7666-soja/. Acesso em 30 ago. 2021.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Insumos agropecuários**. 2021b. Disponível em: www.consultaweb.conab.gov.br/consultas/consultaInsumo.do?method=acaoCarregarConsulta. Acesso em 30 ago. 2021.
- COSKUN, D.; BRITTO, D.; SHI, W.; KRONZUCKER, H. J., Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. **Nature Plants**, v. 3, p. 17074, 2017. DOI:10.1038/nplants.2017.74
- DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. 1196 p. DOI: 10.1002/9781119053095
- DE LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Plant densities and modulation of symbiotic nitrogen fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 181-187, 2014. DOI: 10.1590/S0103-90162014000300002
- DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D.; MENGONI, A.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; HUNGRIA, M.; KASCHUK, G.; BLAIR, M. W.; ORTIZ, R. Advances in host plant and *Rhizobium* genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Advances in Agronomy - book series**. v. 129, p. 1-116. Elsevier Inc., Academic Press, 2015. DOI: 10.1016/bs.agron.2014.09.001
- FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v. 79, p. 139-152, 2002. DOI:10.1016/S0378-4290(02)00119-3
- FREIRE, J. R. J.; VIDOR, C. Rizobiologia. Estudos no Estado do Rio Grande do Sul. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). *A soja no Brasil*. Campinas: ITAL, 1981. p. 417-425.
- GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ROSA, P. A. L.; TRITAPEPE, C. A. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, p. 51-56, 2018. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: SBCS, UFPE; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. p.1-30. CD-ROM.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; LABANDERA, C.; SANJUAN, J. (Ed.). **Biofertilizantes em Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial**. Montevideo: Cyted/Biofag, 2007. p.22-31.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. v. 2. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1009-1023. DOI: 10.1002/9781119053095.ch99
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Mitos, verdades e desafios. In: **Boletim de Pesquisa n. 19, 2019/2020**. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19).
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors impacting N_2 fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000. DOI: 10.1016/s0378-4290(99)00084-2
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; SILVA JÚNIOR, E. B.; ZILLI, J. E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, p. 1106-1112, 2017. DOI: 10.2134/agronj2016.11.0641
- HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; MENDES, I. C.; CHUEIRE, L. M. O.; BATISTA, J. S. S.; MENNA, P. Introdução, estabelecimento e adaptação de bradirrízobios simbiotes da soja em solos brasileiros. In: YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. (Orgs.). **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL, 2015. p. 243-261.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283)
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Eds.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006a. p. 43-93.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N_2 fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006b. DOI: 10.4141/P05-098
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono: avaliação nas culturas do feijoeiro e da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 22 p. (Embrapa Soja. Documentos, 337)
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013. DOI: 10.1007/s00374-012-0771-5
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.66087
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, L. J. M.; MENNA, P.; BRANDI, F.; RAMOS, Y. G. Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 112, p. 5222-5236, 2020. DOI: 10.1002/agj2.20392
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J. 1997. **A inoculação da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 28 p. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 17. EMBRAPA-CPAC. Circular Técnica, 34)
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). **IPCC guidelines for National greenhouse gas inventories**. Disponível em www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/. Acesso em: 30 ago. 2021.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N_2 fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60-69, 2010. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00211.x
- KASCHUK, G.; NOGUEIRA, M. A.; DE LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. **Field Crops Research**, v. 195, p. 21-27, 2016. DOI: 10.1016/j.fcr.2016.05.010
- LA MENZA, N. C.; MONZON, J. P.; LINDQUIST, J. L.; ARKEBAUER, T. J.; KNOPS, J. M. H.; UNKOVICH, M.; SPECHT, J. E.; GRASSINI, P. Insufficient nitrogen supply from symbiotic fixation reduces seasonal crop growth and nitrogen mobilization to seed in highly productive soybean crops. **Plant, Cell & Environment**, v. 43, p. 1958-1972, 2020. DOI: 10.1111/pce.13804

LARA-CABEZAS, W. A. R.; PADUA, R. V. Eficiência e distribuição de nitrogênio aplicado em cobertura na cultura de milho consorciada com *Brachiaria ruziziensis*, cultivada no sistema Santa Fé. **Bragantia**, v. 66, p. 131-140, 2007. DOI: 10.1590/S0006-87052007000100016

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 30**, de 12 de novembro de 2010. 2010. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-30-2010-dou-17-11-10-metodo-inoculantes.pdf/view. Acesso em 30 ago. 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 13**, de 24 de março de 2011. 2011. Disponível em: 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 30 ago. 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 14**, de 13 de abril de 2018. 2018. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/fertilizantes-substratos/InstruoNormativan14_2018.pdf/view. Acesso em 30 ago. 2021.

MORETTI, L. G.; LAZARINI, E.; BOSSOLANI, J. W.; PARENTE, T. L.; CAIONI, S.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield? **Agronomy Journal**, v. 110, p. 715-721, 2018. DOI: 10.2134/agronj2017.09.0540

NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, p. 267-321, 1987. DOI: 10.1080/07352688709382252

NOGUEIRA, M. A.; PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; LIMA, D.; CONTE, O.; HARGER, N.; OLIVEIRA, F. T.; HUNGRIA, M. **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 15 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 143)

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). **The Prokaryotes**. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 427-451. DOI: 10.1007/978-3-642-30141-4_72

ORTEZ, O. A.; TAMAGNO, S.; SALVAGIOTTI, F.; PRASAD, P. V. V.; CIAMPITTI, I. A. Soybean nitrogen sources and demand during seed-filling period. **Agronomy Journal**, v. 111, p. 1779-1787, 2019. DOI: 10.2134/agronj2018.10.0656

PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. **Agronomia Sul Riograndense**, v. 16, p. 205-219, 1980.

PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para a soja em solos de Cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, p. 357-363, 1993.

PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência de fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 193-196, 1984.

PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; LIMA, D.; POSSAMAI, E. J.; REIS, E. A.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M.; CONTE, O. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2019/2020 no Paraná**. 21 p. Londrina: Embrapa Soja, 2020. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 166)

PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; LIMA, D.; POSSAMAI, E. J.; REIS, E. A.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M.; HARGER, N.; CONTE, O. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná**. 19 p. Londrina: Embrapa Soja, 2019. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 156)

REETZ JR., H. F. 2016. **Fertilizers and their efficient use**. Paris: International Fertilizer Use Association, 2016. 110 p.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: fundamentos e aplicações. In: AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; QUECINE-VERDI, M. C.; LACAVA, P. T. (Orgs.). **Biotecnologia microbiana ambiental**. Maringá: EDUEM, 2018. p.125-152.

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

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, e.0200128, 2021. DOI: 10.36783/18069657rbcS20200128

SATURNO, D. F.; CEREZINI, P.; SILVA, P. M.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Mineral N impairment of biological N₂ fixation in soybean: growth types matters? **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, p. 1690-1701, 2017. DOI: 10.1080/01904167.2017.1310890

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. (Eds.). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17)

ZOTARELLI, L.; TORRES, E.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. **Efeito da sucessão soja/trigo no balanço de N em sistema de plantio direto e convencional**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 29)