

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

ANDERSON DANIEL SUSS

**CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS, PRODUTIVAS E FISIOLÓGICAS DA
SOJA SUBMETIDA A INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO COM
Bradyrhizobium japonicum E *Azospirillum brasilense***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2020

ANDERSON DANIEL SUSS

**CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS, PRODUTIVAS E FISIOLÓGICAS DA
SOJA SUBMETIDA A INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO COM
Bradyrhizobium japonicum E *Azospirillum brasilense***

Dissertação de mestrado apresentada
à Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir
Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Suss, Anderson Daniel

Características biométricas, produtivas e fisiológicas da soja submetida a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* / Anderson Daniel Suss; orientador(a), Vandeir Francisco Guimarães, 2020.

78 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Agronomia Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Agronomia. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Fotossíntese. 4. Déficit hídrico. I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Título.

Ativ
Acess



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78660337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 95 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (41) 3284-7878 - Fax: (41) 3284-7879 - CEP 86060-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



ANDERSON DANIEL SÜSS

Características biométricas, produtivas e fisiológicas da soja submetida à inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Vandeir Francisco Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)

Antônio Carlos Torres da Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)

Leandro Rampim

Universidade Estadual do Centro-Oeste - Campus de Guarapuava (UNICENTRO)

Marechal Cândido Rondon, 21 de fevereiro de 2020

*A meus pais, Anildo Suss e Rosani Genesi
Albrecht Suss, assim como ao meu irmão Andrei
Marcos Suss, pois sempre estiveram ao meu lado
apoiando e me dando exemplo de caráter, além
do carinho e apoio para vencer essa etapa.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida e por me proporcionar a oportunidade de conquistar esse título tão almejado, através da saúde e capacidade de aprendizado. Agradeço pelos meus familiares que sempre estiveram presentes, me apoiando para vencer esta etapa.

À minha família que jamais deixou faltar nada em minha vida. Agradeço pelo exemplo de caráter e dedicação. Pelo amor e carinho, pela compreensão nas horas difíceis, não deixando os obstáculos serem maiores que a família, mantendo-a unida e feliz.

Em especial a minha namorada Lyandra P. Franz, que auxiliou na implantação do experimento e sempre me incentivou, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães que através de sua experiência, conhecimento, e amizade me orientou transmitindo confiança, credibilidade e o conhecimento necessário para completar essa etapa.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de realização do Mestrado em agronomia. Em especial aos professores que transmitiram os conhecimentos para a formação do profissional de agronomia.

Aos integrantes do Grupo de Estudos em Fisiologia da Promoção do Crescimento em Plantas (GEFIP), em especial aos pós-graduandos. A Capes, CNPq e NITRO1000 pela bolsa de estudos e materiais para realização do experimento.

A André G. Battistus, Lucas Bulegon, Adriano M. Inagaki, Luiz C. Ofemann pela amizade e pelo incentivo para a realização do Mestrado.

Aos meus amigos Roberto Cecatto Junior, Bruno A. Hermes e Luiz H. Marki, pela amizade e auxílio na condução do experimento.

Aos demais amigos e colegas pela amizade, convivência e ajuda que recebi durante o período do Mestrado.

E a todos que aqui não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

[Henry Ford]

RESUMO

SUSS, Anderson Daniel, Engenheiro agrônomo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro – 2020. **Características biométricas, produtivas e fisiológicas da soja submetida a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.** Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

A soja demanda grande quantidade de nitrogênio uma vez que o elemento constitui aminoácidos, proteínas e lipídios. Além da grande demanda por nitrogênio, a soja também necessita de uma boa disponibilidade hídrica, uma vez que apresenta uma baixa eficiência no uso da água por se tratar de uma planta com metabolismo C₃. Diante da demanda por nitrogênio e água, práticas que aumentam a eficiência na utilização desses recursos são estudadas, dentre elas as bactérias fixadoras de nitrogênio e as promotoras de crescimento vegetal, sendo o *Bradyrhizobium japonicum* e o *Azospirillum brasilense* as mais estudadas. Desta forma, o estudo objetivou avaliar o comportamento das características biométricas, produtivas e fisiológicas da soja em função da inoculação e a co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. Foi utilizado delineamento em blocos ao acaso, com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *Azospirillum brasilense* via sementes e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições. Em cultivo protegido no estádio R₃, foram avaliados as características biométricas e os componentes da produção e a produtividade por vaso. A campo, foram avaliados os componentes da produção e a produtividade da cultura. Em R₃ e R₆ foram efetuadas análises de trocas gasosas da soja submetida ao déficit hídrico, sendo em R₃, determinado o teor relativo de água (TRA), análise do teor foliar de nutrientes e o índice SPAD. No experimento em vasos foram observadas diferenças para a inoculação e co-inoculação para o diâmetro de coleto, número de nódulos por planta, massa seca de raiz e massa seca total. As bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* elevaram o TRA e a taxa de fotossintética da soja em R₃. A inoculação com *A. brasilense* se mostrou capaz de aumentar a eficiência de assimilação do CO₂. Em R₆ a inoculação com *A. brasilense* também promoveu ganhos na fotossíntese. A campo, a altura das plantas e a produtividade foram afetadas positivamente pelo uso de *B. japonicum*, *A. brasilense* e co-inoculação. Diante dos resultados observados, pode-se concluir que a inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* e a co-inoculação, afetam positivamente as características biométricas em condição de vaso, mas não afeta os componentes da produção e produtividade da soja, por outro lado os tratamentos com *B. japonicum* e a co-inoculação influenciam a produtividade da cultura nas condições de campo com aumento de 31%. A inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense*

e co-inoculação elevam o teor relativo de água no estágio fenológico R₃ da soja em 13,58, 22,19 e 18% respectivamente. A inoculação das sementes com *B. japonicum* resultou em maior acúmulo foliar de N e Mg, com incrementos de 47,6 e 42,78% respectivamente, incrementando o teor de clorofila da soja em 6,51%. O uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em inoculação ou co-inoculação promoveu aumento nas taxas fotossintéticas da soja sob a condição de déficit hídrico.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Fotossíntese. Déficit hídrico.

ABSTRACT

SUSS, Anderson Daniel, Agronomist, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February–2020. **Biometric, productive and physiological characteristics of soybean submitted to inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*.** Advisor: Prof. PhD. Vandeir Francisco Guimarães.

Soy demands a large amount of nitrogen since the element constitutes amino acids, proteins and lipids. In addition to the high demand for nitrogen, soybeans also need good water availability, since they have a low efficiency in the use of water because it is a plant with C₃ metabolism. In view of the demand for nitrogen and water, practices that increase efficiency in the use of these resources are studied, including nitrogen-fixing bacteria and plant growth promoters, with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* being the most studied. Thus, the study aimed to evaluate the behavior of the biometric, productive and physiological characteristics of soybean as a function of inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. A randomized block design was used, with 04 treatments (Control; *B. japonicum* inoculation via seeds; Inoculation with *Azospirillum brasilense* via seeds and co-inoculation of *B. japonicum* + *A. brasilense* via seeds) and 06 repetitions. In protected cultivation at the R₃ stage, biometric characteristics and production components and productivity per pot were evaluated. In the field, production components and crop productivity were evaluated. In R₃ and R₆, gas exchange analyzes of soybean submitted to water deficit were performed, in R₃ the relative water content (TRA) was determined, the analysis of the leaf nutrient content and the SPAD index. In the pot experiment, differences were observed for inoculation and co-inoculation for the stem diameter, number of nodules per plant, root dry matter and total dry matter. The bacteria *B. japonicum* and *A. brasilense* increased the TRA and the photosynthetic rate of soy in R₃. The

inoculation with *A. brasilense* proved to be able to increase the efficiency of CO₂ assimilation. In R₆, inoculation with *A. brasilense* also promoted gains in photosynthesis. In the field, plant height and productivity were positively affected by the use of *B. japonicum*, *A. brasilense* and co-inoculation. In view of the observed results, it can be concluded that inoculation with *B. japonicum* and *A. brasilense* and co-inoculation, positively affect biometric characteristics in pot condition, but do not affect the components of soybean production and productivity, on the other hand. On the other hand, treatments with *B. japonicum* and co-inoculation influence the productivity of the culture in the field conditions with an increase of 31%. Inoculation with *B. japonicum*, *A. brasilense* and co-inoculation increase the relative water content in the phenological stage R₃ of soybeans by 13.58, 22.19 and 18% respectively. The inoculation of seeds with *B. japonicum* results in a greater leaf accumulation of N and Mg, with increments of 47.6 and 42.78% respectively, increasing the chlorophyll content of the soybean by 6.51%. The use of the bacteria *B. japonicum* and *A. brasilense* in inoculation or co-inoculation promoted an increase in photosynthetic rates of soybean under the condition of water deficit.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Photosynthesis. Water deficit.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Condição de umidade relativa e temperatura durante a condução do experimento em vasos, barras indicam a umidade relativa e linha horizontal indica as temperaturas em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019.40
- Figura 2: Condição de precipitação e temperatura durante a condução do experimento, e barras indicam as precipitações e linha horizontal indica as temperaturas em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019 43
- Figura 3: Condição de precipitação e temperatura durante a condução do experimento, barras indicam as precipitações e linha horizontal indica as temperaturas em Entre Rios do Oeste, Paraná, 2018 – 2019.44
- Figura 4: Condição de umidade relativa e temperatura durante a condução do experimento em vasos, barras indicam a umidade relativa e linha horizontal indica as temperaturas em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019. 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores médios de altura de planta, diâmetro de coleto, número de nódulos, massa seca de nódulos (MSN), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 45
- Tabela 2: Valores médios para número de vagens, grãos por vagem, massa de cem grãos e produção por plantas da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 50
- Tabela 3: Valores médios de altura de planta, inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos em plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 51
- Tabela 4: Valores médios de altura de planta, inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos em plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, em Entre Rios do Oeste, Paraná, 2019..... 52
- Tabela 5: Valores das condições ambientais no momento das avaliações das trocas gasosas da soja submetida ao déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon – PR, 2019.. 64
- Tabela 6: Valores médios para teor relativo de água (TRA) em soja inoculada e co-inoculadas com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha nos estádios fenológicos R₃ e R₆, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 65
- Tabela 7: Valores médios para o teor foliar de nutrientes e índice SPAD soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estágio fenológico R₃, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 66
- Tabela 8: Valores médios para as trocas gasosas na soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estágio fenológicos R₃, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 67
- Tabela 9: Valores médios para as trocas gasosas na soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estágio fenológicos R₆, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019..... 69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPITULO 1: INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA MEDIANTE USO DE <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i>.....	17
2.1 A CULTURA DA SOJA	17
2.2 MORFOLOGIA, CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS E DÉFICIT HÍDRICO NA SOJA.....	18
2.3 MELHORAMENTO DA SOJA.....	20
2.4 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	22
2.5 <i>Azospirillum brasilense</i>	25
2.7 CUIDADOS COM A INOCULAÇÃO DE <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i>	28
2.8 RESULTADOS ENVOLVENDO A INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO COM <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i> NA CULTURA DA SOJA.....	30
2.9 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E PRODUTIVAS DA SOJA INOCULADA E CO-INOCULADA COM <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i>.....	37
3.1 INTRODUÇÃO.....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2.1 Experimento conduzido em vasos	39
3.2.2 Experimentos conduzidos a campo.....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.3.1 Experimento conduzido em vasos	45
3.3.2 Experimentos conduzidos a campo.....	51

3.4 CONCLUSÕES	55
a. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
4. CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E FOTOSSINTÉTICA DA SOJA INOCULADA E CO-INOCULADA COM <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i> SOB DÉFICIT HÍDRICO, NA FASE REPRODUTIVA	59
4.1 INTRODUÇÃO.....	60
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.3 RESULTADOS	65
4.4 DISCUSSÕES	70
4.5 CONCLUSÕES	74
4.6 REFERÊNCIAS	75
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	78

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja teve origem no oriente, sendo disseminada para outras regiões do planeta (EMBRAPA, 2011). No ano de 1882, no Estado da Bahia chegam as primeiras cultivares de soja ao Brasil (EMBRAPA, 2017), no entanto, foi no Estado do Rio Grande do Sul que houve melhor adaptação das cultivares norte-americanas, onde que a expansão da soja no território só foi possível com os programas de melhoramento, com o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas a regiões de baixa latitude (BONETTI, 1981).

Atualmente, a soja é produzida em larga escala, com uma produção mundial de 362 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor do grão (USDA, 2019). O Brasil ocupa a segunda posição do ranking mundial (CONAB, 2019). Está oleaginosa é utilizada em larga escala para a formulação de ração animal e alimentação humana (PASTORE, 2016), o que se deve a elevada qualidade dos grãos que apresentam alto teor de proteína e óleo em sua constituição (SEDYAMA, 2009).

Devido a qualidade nutricional dos grãos, a soja demanda grande quantidade de nitrogênio uma vez que o elemento constitui aminoácidos, proteínas e lipídios (HUNGRIA et al., 2011). Além da grande demanda por nitrogênio, a soja também necessita de uma boa disponibilidade hídrica, uma vez que apresenta uma baixa eficiência no uso da água por se tratar de uma planta com metabolismo C₃ (TAIZ; ZEIGER, 2013), sendo a maior demanda nas fases de florescimento e formação dos grãos, pois é na fase reprodutiva que são definidos os componentes da produção (FARIAS, NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

Diante da demanda por nitrogênio e água, práticas que aumentam a eficiência na utilização desses recursos são estudadas, dentre elas as bactérias fixadoras de nitrogênio e as promotoras de crescimento vegetal, sendo o *Bradyrhizobium japonicum* e o *Azospirillum brasilense* as mais estudadas. No caso do *B. japonicum*, essas bactérias possibilitam que o nitrogênio atmosférico seja transformado em amônio, tornando-se disponível para a soja (TAIZ; ZEIGER, 2013). O Brasil é referência na utilização de inoculantes contendo *B. japonicum*, onde a simbiose entre planta e bactéria é capaz de fornecer todo o nitrogênio requerido pela cultura da soja, além de disponibilizar parte do nitrogênio para a cultura subsequente (HUNGRIA et al., 2007).

Em relação as bactérias promotoras de crescimento, o *A. brasilense* pode sintetizar ou estimular a produção de compostos promotores de crescimento (RODRIGUES et al., 2012), dentre eles, fitormônios como auxinas, citocininas e giberilinas (NETO et al., 2013). Além dos compostos promotores de crescimento que favorecem o crescimento radicular e das

plantas, a utilização de *A. brasilense* auxilia na solubilização de fosfatos no solo, diminuição dos níveis de etileno e indução de resistência nas plantas entre outros efeitos benéficos aos vegetais (OLIVEIRA et al., 2003).

Outra prática estudada e utilizada por parte dos produtores é a co-inoculação, a qual permite a obtenção do efeito sinérgico da combinação de microrganismos, com resultados mais promissores quando comparados a inoculação padrão (BÁRBARO et al., 2008). A co-inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento permite o maior crescimento radicular e nodulação na soja (FERLINI, 2006), aumentando a absorção de água e nutrientes além de aumentar o suprimento de nitrogênio advindo da fixação biológica.

No entanto, para que sejam obtidos bons resultados com esses microrganismos alguns cuidados devem ser tomados para evitar a mortalidade das bactérias. Deve se atentar com a distribuição do inoculante, semear dentro do período de 24 horas após a inoculação das sementes, evitar o contato das sementes com agroquímicos e não expor as sementes ao déficit hídrico e altas temperaturas (HUNGRIA, 2011). O uso dessas bactérias mostra-se como uma ferramenta promissora para os produtores de soja, possibilitando a redução nos custos de produção com incrementos na fotossíntese e produtividade.

Portanto, o presente estudo buscou avaliar as formas de inoculação e co-inoculação na cultura da soja com a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias promotoras de crescimento vegetal sobre as características biométricas, produtivas e fisiológicas da soja.

2. CAPITULO 1: INOCULAÇÃO E CO-INOCOLUÇÃO NA CULTURA DA SOJA MEDIANTE USO DE *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense*

2.1 A CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max* L.) teve origem no extremo Oriente (EMBRAPA, 2011), mais precisamente na região correspondente a China (CÂMARA, 2015). Das plantas cultivadas, a oleaginosa é uma das culturas mais antigas, com registros no período entre 2883 e 2838 a.C, quando era considerado um grão sagrado por constituir a base alimentar dos chineses (EMBRAPA, 2005), sendo disseminada a outras regiões do planeta, através de imigrantes orientais e viajantes ingleses (HYMOWITZ, 1990).

No século XX houve o desenvolvimento das primeiras cultivares de soja e um rápido crescimento na produção devido ao início do cultivo comercial nos Estados Unidos, onde no ano de 1882 chegaram ao Brasil as primeiras cultivares no Estado da Bahia (EMBRAPA, 2017). No ano de 1914 no Estado do Rio Grande do Sul foram implantadas as primeiras áreas comerciais com as cultivares trazidas dos Estados Unidos, sendo que nessa região as cultivares tiveram melhor adaptação as condições edafoclimáticas, sendo que o avanço para regiões de baixas latitudes só foi possível com a implantação de programas de melhoramento (BONETTI, 1981; KIIL; AMP; GARCIA, 1989).

O cultivo de soja apresenta grande importância para o agronegócio e economia mundial, sendo uma das culturas mais produzidas e consumidas, apenas ficando atrás das culturas do milho, trigo e arroz (HIRAKURI; LAZZAROTO, 2011). A produção global da oleaginosa atinge aproximadamente 362 milhões de toneladas, sendo que Estados Unidos ocupa a primeira posição entre os países produtores, com produção de 123,664 milhões de toneladas, em 35,657 milhões de hectares (USDA, 2019). A segunda posição no ranking mundial dos países produtores de soja pertence ao Brasil, com produção de 114,843 milhões de toneladas em 35,822 milhões de hectares cultivados (CONAB, 2019).

No Brasil, aproximadamente 60% da soja é produzida pelos Estados do Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná. O maior produtor nacional da oleaginosa é o Estado do Mato Grosso que produziu 32,455 milhões de toneladas em 9,7 milhões de hectares cultivados na última safra. O segundo maior produtor nacional é o Estado do Rio Grande do Sul, com uma produção de 19,187 milhões de toneladas em uma área de 5,8 milhões de hectares. A terceira

posição do ranking nacional pertence ao Estado do Paraná com produção de 16,253 milhões de toneladas em uma área de 5,4 milhões de hectares (CONAB, 2019).

No âmbito nacional a soja é uma das culturas responsáveis pelos bons resultados econômicos do agronegócio, rica em proteínas (40 %) e óleo (20 %), certamente é uma das espécies cultivadas de maior importância (SEDIYAMA, 2009). Por ser fonte de proteínas é utilizada em larga escala para a formulação de ração animal, além de compor produtos destinados a alimentação humana (PASTORE, 2016). A proteína da soja também é utilizada para a produção de adesivos, nutrientes, adubos, fabricação de fibra entre outros produtos. No caso o óleo de soja, é amplamente utilizado na indústria de alimentos. (EMBRAPA, 2007).

O mercado interno brasileiro consome 44 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2019). No caso das exportações, no ano de 2018 foram exportados 83,6 milhões de toneladas de soja em grãos, resultando em uma arrecadação de 33,2 bilhões de dólares no mercado externo. Já as exportações de farelo e óleo de soja somam o montante de 8,1 bilhões de dólares arrecadados, onde o total arrecadado pelo país no mercado externo soma o montante de 41 bilhões de dólares (AGROSTAT, 2018).

Devido a programas de melhoramento, a oleaginosa pode ser cultivada em praticamente todo Brasil, com médias de produtividade superiores a outros países. Esses patamares de produtividade são obtidos com o uso de cultivares adaptadas ao clima tropical com bons volumes de chuva, disponibilidade de luz, solos com boa fertilidade além do manejo adotado pelos produtores, como por exemplo a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio (CÂMARA, 2015).

2.2 MORFOLOGIA, CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS E DÉFICIT HÍDRICO NA SOJA

Com hábito rasteiro em seus primórdios, a soja foi domesticada e melhorada até o padrão atual por meio de cruzamentos entre espécies selvagens (EMBRAPA, 2005). Atualmente a soja é uma cultura anual com porte ereto e autógama. O porte de plantas varia de 30 a 200 cm com ramificações e ciclo variando de 70 a 200 dias. As flores nascem nos racemos axilares e podem apresentar coloração branca, rósea ou violácea (BORÉM, 1999).

O sistema radicular da soja é pivotante com raízes secundárias em grande quantidade. Já as folhas estão dispostas de forma alternada compostas de três folíolos lanceolados ou ovalados (EMBRAPA, 2014). Quanto ao tipo de crescimento da soja, este pode ser

determinado, semi-determinado e indeterminado, com resistência a deiscência de vagens. As hastes e vagens são de coloração cinza ou marrom, podendo apresentar resistência a pragas doenças e herbicidas (SEDYAMA et al., 2015).

A faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento e crescimento da soja é entre 20 e 30 °C, sendo que a faixa de temperatura do solo para uma germinação e emergência adequada também se situa nesses valores, sendo 25 °C a temperatura considerada ideal (MAPA, 2014). Em condições de altas temperaturas a soja pode antecipar o florescimento e o fotoperíodo (duração de horas de luz em um dia), a soja é uma planta de dias curtos onde a indução do florescimento ocorre mais rapidamente em dias de menor período de luz, sendo que essas respostas ao fotoperíodo variam entre as cultivares (FARIAS et al., 2009).

A necessidade hídrica da soja varia de 450 a 800 mm durante o ciclo de desenvolvimento, com maior demanda na fase reprodutiva (SOUZA et al., 2016), onde o suprimento adequado de água nas fases de floração e enchimento de grãos é de extrema importância, pois é na fase reprodutiva que a cultura da soja define os componentes de produção (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

A soja é uma planta que demanda grande disponibilidade hídrica pois apresenta baixa eficiência no uso da água. Por se tratar de uma planta C₃ a soja necessita manter os estômatos abertos por mais tempo pois apresenta baixa eficiência na utilização do carbono, o que acaba favorecendo a perda de água pela transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estudos comparando a soja (C₃) e o milho (C₄), mostram que as taxas fotossintéticas são semelhantes, entretanto, a soja apresenta transpiração bem superior em comparação a cultura do milho, apresentando uma eficiência no uso da água em torno de 50% inferior ao cereal (YU; WANG; ZHUANG, 2004).

Em condições de baixa disponibilidade hídrica os componentes de produção são seriamente afetados, pois ocorre o abortamento de estruturas reprodutivas, abscisão de folhas e redução na massa de grãos (VIEIRA et al., 2013). Isso ocorre pois na fase reprodutiva, o déficit hídrico leva ao fechamento de estômatos das plantas nas horas mais quentes, reduzindo as trocas gasosas entre a planta e o ambiente, resultando na formação de vagens vazias e abortamento de vagens, reduzindo a produtividade da soja (FARIAS et al., 2007).

O déficit hídrico também compromete seriamente o processo de fixação biológica de nitrogênio, pois ocorre uma redução na emissão de pêlos radiculares, redução na síntese de leghemoglobina e abortamento de nódulos, onde o nódulo desidrata e cessa a atividade da enzima nitrogenase, sendo o processo de fixação biológica reativado se o período de déficit hídrico for de curta duração (REIS JUNIOR, 2008).

No caso da demanda nutricional, para cada tonelada de grãos de soja produzida por hectare são necessários aproximadamente 80 kg de nitrogênio, 15 kg de fósforo, 38 kg de potássio, 12 kg de cálcio, 7 kg de magnésio, 15 kg de enxofre, 77 g de boro, 515 g de cloro, 26 g de cobre, 460 g de ferro, 130 g de manganês, 7 g de molibdênio e 61 g de zinco (EMBRAPA, 2014). O nitrogênio é o elemento mais demandado, uma vez que o elemento é constituinte de aminoácidos, proteínas e lipídeos (HUNGRIA et al., 2011), entretanto, a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio com estirpes de *Bradyrhizobium* são capazes de estabelecer simbioses capazes de suprir mais de 300 kg de nitrogênio por hectare, suprimindo a demanda da planta pelo elemento, além de liberar o elemento para a cultura subsequente (HUNGRIA et al., 2007).

A deficiência do nitrogênio acarreta em redução da fotossíntese, produção e translocação de fotossintatos, crescimento de raízes e folhas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, a deficiência deste elemento reduz os teores de proteínas nos grãos, provoca clorose severa nas folhas velhas, podendo levar a necrose, o que se deve a baixa produção de clorofila (SFREDO; OLIVEIRA, 2010), impactando negativamente na produtividade da cultura.

Diante da importância da água e do nitrogênio para o crescimento da soja, formas de manejo que maximizem o aproveitamento de água e nutrientes são estudadas, com ênfase ao uso de reguladores vegetais e bactérias promotoras de crescimento vegetal com destaque ao *A. brasilense* e o *B. Japonicum* (BULEGON, 2019).

2.3 MELHORAMENTO DA SOJA

No Brasil, os programas de melhoramento de instituições públicas e privadas, desenvolveram cultivares adaptadas as condições ambientais do país, alavancando o potencial produtivo da soja. Na década de 1990, inúmeras empresas brasileiras de pesquisa juntamente com os bancos de germoplasma foram compradas por empresas multinacionais, sendo a Monsanto a multinacional mais atuante nesse processo (SANTOS et al., 2014). O estudo e o desenvolvimento de novas biotecnologias permitiram com que os produtores brasileiros atingissem altos patamares de produtividade (BARBARO-TORNELLI et al., 2018).

O cruzamento de diferentes espécies selvagens, além de ter alterado o hábito rasteiro para arbustivo também permitiu a incorporação de genes exóticos ao da soja, tornando a cultura apta a produzir novas substâncias conferindo tolerância a alguns herbicidas, como é

o caso do glifosato (MENEGATTI; BARROS, 2007). A soja resistente a Roundup Ready (RR), foi modificada com a inserção de um gene da bactéria *Agrobacterium sp.* tornando a planta resistente ao herbicida glifosato facilitando o controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas que competem com a soja em pós emergência (KLEBA, 1998).

Outra tecnologia incorporada na cultura da soja é a Intacta[®] a qual além da resistência ao glifosato, oferece proteção contra algumas lagartas através da proteína Bt (Cry1Ac), com alta eficácia contra *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja), *Chrysodeixis includens* (mede palmo), *Crociosema aporema* (broca das axilas), *Heliothis virescens* (lagarta das maçãs), *Elasmopalpus lignosellus* (elasma) e *H. zea* e *H. armígera* (Helicoverpa) (MONSANTO, 2016).

No caso do manejo de doenças, a empresa Tropical Melhoramento Genético (TMG) desenvolveu a tecnologia INOX[®] que confere tolerância a ferrugem asiática, podendo reduzir o uso de fungicidas. A folha da soja tolerante, ao entrar em contato com o fungo causador da ferrugem asiática reage em defesa originando uma lesão de cor marrom avermelhada que não compromete o desenvolvimento da planta e impede a esporulação e instalação da doença na planta (SOJA INOX, 2019).

Além de todas as biotecnologias, os programas de melhoramento permitiram o desenvolvimento de cultivares com período juvenil longo, impulsionando o cultivo para regiões de baixa latitude, permitindo com a que a soja seja cultivada em praticamente todas as regiões do país (CÂMARA, 2015).

Já no ano de 1963, uma determinação da Comissão Nacional da Soja, direcionou os programas de melhoramento ao desenvolvimento de cultivares responsivas a inoculação com estirpes efetivas de *Bradyrhizobium*, onde os programas de melhoramento passaram a omitir a fertilização nitrogenada (HUNGRIA et al., 2005). Os programas de melhoramento no Brasil possibilitaram o desenvolvimento de cultivares efetivas na fixação biológica de nitrogênio onde a soja nacional apresenta grande vantagem frente a outros países produtores, enquanto que na China as estirpes de *Bradyrhizobium* tem concorrência natural com outros microrganismos, na Argentina, o clima e os solos alcalinos dificultam os avanços nessa tecnologia (VARGAS et al., 2004).

2.4 *Bradyrhizobium Japonicum*

O aumento de produtividade da cultura da soja está associado ao emprego de novas tecnologias. São exemplos, o melhoramento genético e a utilização de bactérias fixadoras de

nitrogênio (HUNGRIA et al., 2001). O nitrogênio é responsável pelos incrementos de proteína e da produtividade (FAGAN et al., 2007) atuando diretamente na produção de fotoassimilados essenciais para a soja, pois atua na fotossíntese (ANDRADE, 1996).

Na atmosfera terrestre, o nitrogênio representa em torno de 78% dos gases presentes, sendo o elemento mais abundante. Nos vegetais, o nitrogênio é responsável por inúmeras reações sendo constituinte da molécula de clorofila, proteínas e enzimas, sendo essencial para a fotossíntese, produção e translocação de fotoassimilados, formação e crescimento de folhas e raízes (RYLE et al., 1979; TAIZ E ZEIGER, 2013) atuando diretamente na produção de fotoassimilados essenciais para a soja, pois atua na fotossíntese (ANDRADE, 1996). O elemento é demandado pela maioria das culturas, entretanto, sua mobilidade no solo e volatilidade acaba resultando em perdas do elemento, sendo um dos entraves a produtividade (GALVÃO, 2012).

O nitrogênio pode ser absorvido na forma de amônio, nitrato ou nitrogênio atmosférico pelo processo da fixação biológica. Na soja o nitrogênio atmosférico é transformado em amônio por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (TAIZ; ZEIGER 2013). Essas bactérias se associam as plantas de soja formando nódulos em suas raízes, promovendo a quebra da tripla ligação do nitrogênio atmosférico, tornando-o prontamente disponível (FAGAN et al., 2007).

A interação entre planta e bactéria pode ser classificada como uma, pois o *Bradyrhizobium* beneficia-se dos fotoassimilados ou carbono orgânico oriundos da planta hospedeira, enquanto que esses microrganismos fornecem nitrogênio oriundo da fixação, sendo o nutriente assimilado em compostos nitrogenados que podem ser translocados pela planta (CASSINI; FRANCO, 2008). O processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), permite com que a soja seja economicamente viável no Brasil, uma vez que a demanda de N pela soja é de aproximadamente 80 kg por hectare para cada tonelada de grãos produzida. Estima-se que anualmente sejam economizados 7 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados, apenas com o uso de inoculantes contendo estirpes de *B. japonicum* (HUNGRIA, 2014).

No Brasil, os inoculantes mais utilizados contendo *Bradyrhizobium* podem conter a combinação de duas ou quatro estirpes, sendo as estirpes Semia 587 e Semia 5019 (29w) contendo *Bradyrhizobium elkanii* e as estirpes Semia 5079 (CPAC-15) e Semia 5080 (CPAC-7) contendo *Bradyrhizobium japonicum* (ZILLI et al., 2006; BIZARRO, 2008), sendo que o Brasil é referência na utilização de estirpes de *Bradyrhizobium* na cultura da soja, com simbioses capazes de suprir toda demanda de nitrogênio da oleagionosa, com

contribuições acima de 300 kg ha⁻¹, além da liberação do elemento para a cultura subsequente (HUNGRIA et al., 2007).

O processo de FBN inicia-se através da liberação de exsudatos radiculares, possibilitando atração quimiotática do *Bradyrhizobium* com a soja. A associação ocorre na formação dos pêlos radiculares, resultando na formação dos nódulos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Como os rizóbios captam os sinais da planta, as melhores respostas a inoculação vão ocorrer quando as bactérias estão próximas ao sistema radicular, o que ocorre principalmente quando a inoculação é realizada no tratamento de sementes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os nódulos são formados a partir do enovelamento dos pêlos radiculares em razão de estímulos bacterianos hormonais, sendo resultantes da interação entre bactérias rizobiáceas e plantas leguminosas, onde os baixos níveis de oxigênio dentro do nódulo proporcionam as condições ideais para a FBN, uma vez que a fixação de nitrogênio só ocorre quando a nitrogenase trabalha em condições de baixa disponibilidade de oxigênio por se tratar de uma sequência de reações redox e com transporte de elétrons, uma vez que na presença de oxigênio esses elétrons são capturados pelo oxigênio, impedindo que os mesmos liguem as moléculas de hidrogênio juntamente a molécula de nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Apenas organismos que apresentam o complexo nitrogenase são capazes de realizar a FBN. No complexo nitrogenase ocorre uma série de reações redox através de complexos proteicos constituídos de ferro e molibdênio, possibilitando a redução do nitrogênio atmosférico para a amônia, tornando o nitrogênio disponível para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Devido ao grande gasto energético das bactérias neste processo, o fornecimento de nitrogênio pode prejudicar o processo, pois ocorre a redução da afinidade da leghemoglobina pelo oxigênio (VOSS; CUNHA, 1996).

Além da redução da afinidade da leghemoglobina, quando se fornece o nitrogênio via adubação mineral, a soja vai absorver o elemento do solo na forma de amônio ou nitrato, dificultando a simbiose uma vez que a planta demanda de energia para o processo. Entretanto, quando não se fornece nitrogênio, ocorre a indução da enzima fenilalanina amônia liase a qual produz isoflavonas que sinalizam ao *B. japonicum* para que infeccione a soja e produza nódulos (ALMEIDA, 2015).

A infecção da soja pelo *B. japonicum* leva de 7 a 13 horas para formarem as gerações, apresentando crescimento lento, onde a temperatura ótima para seu desenvolvimento se situa entre 25 a 30°C (WILLEMS, 2006). Na primeira semana após a emergência já são observados os primeiros nódulos, onde o processo da FBN inicia por volta da segunda semana após a emergência da soja (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001). Para adequada

atividade dos nódulos e da enzima nitrogenase, a temperatura ideal é de 25°C, sendo que temperaturas abaixo de 15°C reduzem sua atividade (ZHANG et al., 1996).

A formação dos nódulos é controlada por auxinas e citocininas, os quais promovem a divisão celular (ANOLLÉS, 1997). Durante o processo de infecção ocorre uma inibição no transporte de auxinas para outras partes da planta, onde a regulação é mediada por lipoquitinas e oligosacarídeos, resultando em um acúmulo de auxinas na região de desenvolvimento do nódulo (MATHESIUS; SCHLAMMAN, 1998).

Após a divisão celular, se dá a formação do nódulo, onde ocorre o crescimento da estrutura, e a diferenciação em organelas fixadoras denominadas de bacteróides, e a membrana que o envolve é denominada de peribacteróide apresentando um sistema vascular semelhante ao da planta, permitindo as trocas de nitrogênio fixados pelo bacteróide e a planta. No interior do bacteróide, encontra-se o complexo nitrogenase, formado pelas proteínas Ferro- proteína e a Molibdênio-Ferro-proteína, responsáveis pelo processo de fixação de nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No processo de fixação de nitrogênio a ferredoxina doa elétrons para a Ferro-proteína. A Ferro-proteína promove a redução da enzima Molibdênio-Ferro-proteína, sendo que a partir desta, os elétrons são doados para o nitrogênio, o qual é convertido à amônia (TAIZ; ZEIGER, 2013). Durante o processo de fixação, os nódulos ativos irão apresentar coloração interna avermelhada, o que se deve à atividade da leghemoglobina, a qual atua no controle dos níveis de oxigênio no nódulo. O nitrogênio fixado na forma de amônia durante o processo simbiótico é posteriormente convertido em aminoácidos e precursores de proteínas, sendo posteriormente utilizado pela planta (THOMAS; COSTA, 2010).

Para a soja ter sua demanda por nitrogênio atendida e alcançar altas produtividades, as plantas devem apresentar de 15 a 30 nódulos no florescimento e apresentar de 100 a 200 mg de nódulos por planta (HUNGRIA et al., 2001). Para que ocorra uma nodulação adequada é necessário a inoculação de *B. japonicum* na soja de forma rotineira, pois a soja é uma cultura exótica, sendo pouco provável que as estirpes que ocorrem de forma natural nos solos brasileiros sejam compatíveis com a cultura (BÁRBARO et al., 2009). Nesse sentido, cabe ressaltar a importância de pesquisas conduzidas com *Bradyrhizobium* de modo a aumentar a competitividade com os demais organismos presentes no solo.

A utilização das bactérias fixadoras de nitrogênio, além de ser uma prática de baixo custo e com boa eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico, também são responsáveis pela redução do uso de adubos minerais, resultando em redução dos custos de produção e diminuição dos riscos de contaminação do ambiente por nitrato (THOMAS, COSTA, 2010).

Dessa forma diante da importância dessas bactérias para a produção da soja, novas formas de melhorar esse processo da FBN são estudadas constantemente, principalmente no desenvolvimento de inoculantes mais estáveis e eficientes.

2.5 *Azospirillum brasilense*

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* podem estimular o crescimento da planta através de compostos promotores de crescimento além de estimularem a produção endógena na planta (RODRIGUES et al., 2012). Estas bactérias desenvolvem suas colônias na rizosfera das plantas, mas podem penetrar no vegetal, sendo denominadas associativas facultativas (DÖBEREINER; BALDANI, 1982). Na rizosfera beneficiam-se de exsudatos radiculares como fonte energética, demonstrando mobilidade e quimiotaxia para ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, compostos aromáticos além de fontes de carbono provenientes de exsudatos radiculares (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Esse grupo de microrganismos, possuem mecanismos benéficos de ação direta e ação indireta. A síntese de fitormônios de crescimento, aumento do crescimento radicular e solubilização de fosfatos são exemplos de mecanismos de ação direta, por outro lado, diminuição dos níveis de etileno endógeno, indução de resistência nos vegetais e produção de antibióticos são alguns exemplos de mecanismos de ação indireta (OLIVEIRA et al., 2003).

A síntese de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas é um dos principais efeitos atribuídos ao *A. brasilense* (NETO et al., 2013). As auxinas são responsáveis pela síntese de giberelinas além de promoverem o crescimento celular, pois acidificam o apoplasto, ativando enzimas responsáveis pelo afrouxamento da parede celular, o que permite com que a pressão de turgor promova o crescimento da célula (TAIZ; ZEIGER, 2013). No caso das citocininas, a promoção da retomada de divisões celulares é o principal efeito do fitormônio, estando relacionado a formação dos nódulos radiculares nas leguminosas (KERBAUY, 2004).

Outro benefício da utilização de *A. brasilense* está atrelado a síntese de ácido abscísico (ABA), o qual está associado ao maior crescimento do sistema radicular das plantas em condições de estresses nutricionais ou déficit hídrico, atuando na redução do crescimento da parte aérea em favor do crescimento do sistema radicular, dessa forma essas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) favorecem o desenvolvimento

radicular, permitindo com que as plantas explorem de forma mais eficiente o perfil do solo (CASSÁN, PERRIG, et al., 2009), favorecendo a absorção de água e nutrientes pois aumenta o contato do sistema radicular com o solo, além de auxiliar na formação de pelos radiculares (FERREIRA et al., 2014).

A síntese de óxido nítrico é outro benefício promovido pela utilização de *A. brasilense*, onde alguns trabalhos demonstram que a síntese dessa molécula por essas bactérias pode favorecer o crescimento de raízes secundárias (CREUS et al., 2005), o número maior de raízes secundárias, associado a formação de pêlos radiculares beneficia o contato solo-raiz aumentando a absorção de água e nutrientes. A maior absorção de água devido a inoculação com *A. brasilense* permite maior crescimento das plantas, pois ocorrem incrementos nas trocas gasosas (FRANDOLOSO et al., 2012) pois a água é crucial para a fotossíntese, além de possibilitar o alongamento celular pela pressão de turgor (CATUCHI et al., 2012).

Essas bactérias também podem atuar no sistema radicular das plantas pois agem sobre algumas enzimas do metabolismo do nitrogênio como a glutamina sintetase que catalisa a reação de formação de glutamina a partir de glutamato, amônio e ATP aumentando a assimilação de amônio em aminoácidos, auxiliando no aporte de nitrogênio até a parte aérea (MACHADO et al., 1998).

Por outro lado, a elevação nos níveis de auxina acaba aumentando o teor de ACC que é precursor de etileno, resultando em algumas respostas como aumento da respiração, inibição do crescimento e senescência da planta (GLICK, 2014). Entretanto, o *A. brasilense* é capaz de desviar o ACC pela enzima ACC-deaminase, gerando amônia para a produção de aminoácidos para serem utilizados no seu metabolismo diminuindo os níveis de etileno na planta (ARSHAD et al., 2007).

Além dos benefícios relacionados ao crescimento das plantas, o *A. brasilense* pode induzir a resistência das plantas, contra patógenos e estresses ambientais (ZHANG et al., 2010). As BPCV são capazes de excretar compostos tóxicos a outros organismos, atuando de forma antagônica contra patógenos (GLICK, 2014).

Já a contribuição da fixação de nitrogênio pelo *A. brasilense* é questionada, uma vez que esse grupo de microrganismos libera lentamente o nitrogênio para a planta, e apenas uma quantidade muito pequena do elemento se torna disponível para a planta (DOMMELEN et al., 1998), além disso a quantidade de nitrogênio secretada durante o crescimento das bactérias é muito baixa (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Vale destacar, que as bactérias do gênero *Azospirillum* não estimulam a nodulação nas plantas, uma vez que essas bactérias apenas colonizam áreas superficiais, podendo locomover-se no interior da planta via xilema e floema (TORTORA et al., 2012). Como essas bactérias ficam expostas a altas concentrações de oxigênio, não há atividade do complexo enzimático nitrogenase (TAIZ; ZEIGER, 2013). Outro obstáculo que impede a nodulação por esses microrganismos se dá pela dificuldade de se aderirem as estruturas dos vegetais (PEREG GERK et al., 2000).

2.6 CO-INOCULAÇÃO

A co-inoculação é uma alternativa que busca aumentar a produtividade das áreas de soja. Essa técnica busca a obtenção do efeito sinérgico da combinação de microrganismos, buscando obter resultados produtivos superiores com a inoculação de ambos, em comparação a utilização dos microrganismos de forma isolada (BÁRBARO et al., 2008). Para a co-inoculação na soja, alguns produtores optam por inoculantes contendo *A. brasilense* juntamente com *B. japonicum*. De acordo com Ferlini (2006), a utilização de bactérias simbióticas e diazotróficas favorecem a nodulação e o crescimento radicular.

O aumento do crescimento radicular está associado ao efeito bioregulador promovido pela inoculação com *A. brasilense* (PEDRAZA, 2008) o que está relacionado a síntese de hormônios como auxinas, giberilinas e citocininas (NETO et al., 2013). A síntese de óxido nítrico é outro efeito atribuído a utilização de *A. brasilense*, sendo essa molécula sintetizada responsável pela formação de raízes secundárias e pêlos radiculares (CREUS et al., 2005). O incremento nas raízes secundárias, pêlos radiculares e ramificações dos pêlos pela utilização de *A. brasilense* também podem estar associados ao incremento na produção de genes Nod, que favorecem diretamente o processo de nodulação na cultura da soja (BURDMANN HAMAQUI; OKON, 2000) uma vez que a associação do *B. japonicum* e a planta que resultará na formação dos nódulos, inicia-se a partir dos pêlos radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*, resulta em plantas mais resistentes ao déficit hídrico pelo aumento do sistema radicular. Outro efeito da co-inoculação são plantas mais vigorosas devido a maior absorção de nutrientes, resultando em maior equilíbrio nutricional, além disso, o aumento da superfície específica pelo aumento do sistema radicular permite maior nodulação favorecendo a fixação de nitrogênio e aumentando a produtividade da soja (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2014).

A associação desses microrganismos permite uma agricultura mais sustentável economicamente, ambientalmente e socialmente (CHAPARRO et al., 2012), tendo em vista os benefícios promovidos por essas bactérias, pois torna as plantas mais eficientes no uso da água e fertilizantes, uma vez que o *A. brasilense* permite maior crescimento radicular, além de permitir um maior aporte de nitrogênio advindo da FBN promovida pelo *B. japonicum*. (HUNGRIA, 2011).

2.7 CUIDADOS COM A INOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense*

Além da utilização de inoculantes de qualidade, são necessários alguns cuidados a fim de evitar a mortalidade das bactérias, principalmente quando se utiliza os inoculantes conjuntamente com fungicidas, inseticidas e micronutrientes (HUNGRIA et al., 2013). É importante a distribuição uniforme do inoculante sobre as sementes e evitar a exposição das sementes ao sol. Após a inoculação semear dentro de um prazo de 24 horas e o inoculante deve ser colocado por último em sementes tratadas com fungicidas, inseticidas ou micronutrientes e quando as bactérias são expostas a agroquímicos, altas temperaturas ou déficit hídrico a dose do inoculante deve ser aumentada (HUNGRIA, 2011).

Em áreas novas de cultivo de soja, com acidez elevada com pH menor que 5,5 é recomendado utilizar o dobro da dose de inoculante contendo *B. japonicum* uma vez que a acidez interfere na sobrevivência desses microrganismos, além de ocorrer competição entre as estirpes nativas e as contidas nos inoculantes (CHUEIRI et al., 2005). O aumento da quantidade de inoculante pode compensar a perda de organismos por condições adversas, além de favorecer a competição com os microrganismos nativos (HUNGRIA et al., 2001). Além disso, a reinoculação anual de *B. japonicum* é uma prática crucial a ser adotada pelos produtores de soja, pois permite a mitigação no estabelecimento de populações de microrganismos menos eficientes que poderiam competir pelos sítios de infecção com o *B. japonicum* (CARVALHO et al., 2005).

Para o *B. japonicum* é importante atentar-se com os micronutrientes Cobalto e Molibdênio, onde o primeiro atua na formação da leghemoglobina controlando a disponibilidade de oxigênio para o funcionamento da nitrogenase, e o segundo participa do complexo nitrogenase, onde sua deficiência compromete o processo de fixação biológica de nitrogênio (ARAUJO, 2013).

O fornecimento de nitrogênio pode prejudicar o processo da fixação biológica de nitrogênio devido ao grande gasto energético no processo, pois ocorre a redução da afinidade da leghemoglobina pelo oxigênio (VOSS; CUNHA, 1996). Temperaturas abaixo de 15 C° vão reduzir a atividade das bactérias (ZHANG et al., 1996).

O déficit hídrico dificulta a respiração e a síntese de leghemoglobina pois reduz o fornecimento de oxigênio para o bacteroide. O uso de agroquímicos e o teor de O₂ afetam a sobrevivência das bactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Situações de deficiência na nodulação podem ser visualizadas pelo arranque das plantas quando a soja se encontra em V₂, podendo o problema ser amenizado com adubação mineral de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2005).

No caso do *A. brasilense*, o maior desafio é a incompatibilidade com produtos químicos, pois acabam sendo prejudiciais as populações das BPCV, demandando mais estudos de compatibilidade com inseticidas (HUNGRIA, 2011). Os cuidados com a inoculação de *A. brasilense* são semelhantes a inoculação de *B. japonicum*. As sementes inoculadas com as bactérias não devem ser expostas ao sol e a temperaturas elevadas. Também deve-se semear as sementes inoculadas no prazo de 24 horas e evitar o contato das bactérias com produtos químicos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007), caso houver o contato com produtos químicos a dose do inoculante pode ser aumentada com o intuito de aumentar o número de células de *Azospirillum* (HUNGRIA, 2011).

Além de todos os cuidados no manuseio do inoculante, os produtores devem tomar alguns cuidados no momento da compra do inoculante contendo *A. brasilense*. Deve ser observado se o produto possui registro no Ministério da Agricultura e se contém as estirpes validadas pela pesquisa, observar o prazo de validade, certificar que os inoculantes foram armazenados em local com condições adequadas de umidade e temperatura e verificar se o produto possui a concentração de 10⁸ células g⁻¹ ou mL⁻¹(HUNGRIA,2011).

Outra alternativa para reduzir a mortalidade das BPCV seria a pulverização foliar, onde a interação entre bactéria e o produto químico é evitada (BATTISTUS, 2015). Diante dos problemas abordados, novas técnicas de inoculação e co-inoculação são estudadas, buscando avaliar doses e métodos de aplicação que resultem em melhores respostas (RONSANI; PINHEIRO; PURIN, 2013).

2.8 RESULTADOS ENVOLVENDO A INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA

Os resultados envolvendo *B. japonicum* e *A. brasilense* na cultura da soja acabam apresentando respostas distintas. Hungria et al. (2013) avaliando esses microrganismos, obtiveram incrementos na produtividade na ordem de 8,4% na re-inoculação anual com *B. japonicum*, enquanto que para a co-inoculação o incremento foi de 16% em relação a testemunha, e 7,1% a mais do que a inoculação apenas com *B. japonicum*. Resultado semelhante foi observado por Libório (2019), onde que a co-inoculação incrementou em 20,78% a produtividade da soja.

Braccini et al. (2016) avaliando a inoculação nas sementes e a co-inoculação no sulco de semeadura, constataram incrementos nos parâmetros fisiológicos bem como incrementos no rendimento de grãos em relação a testemunha. Deak (2017), verificou que a co-inoculação incrementou na massa seca de nódulos e número de nódulos. Finoto et al. (2017) observaram que a co-inoculação apresentou resultados semelhantes ao tratamento somente com *B. japonicum* mas com três vezes da dose recomendada para os parâmetros relacionados a nodulação da soja, altura de plantas e produtividade de grãos.

Entretanto, em estudo envolvendo BCPV, Mattos (2017) observou que a inoculação com *A. brasilense* não incrementou na produtividade da soja, além de não influenciar os parâmetros biométricos.

Resultados semelhantes foram verificados por Zuffo et al. (2015), que observaram que a inoculação apenas com *A. brasilense* e a co-inoculação com *B. japonicum* não afetaram significativamente a altura de plantas, número de trifólio, massa seca da parte aérea, massa seca de raiz e de nódulos, volume radicular, teor de clorofila e de nitrogênio foliar. Bullegon et al. (2016) verificaram respostas distintas entre cultivares, onde a inoculação com bactérias diazotróficas elevou a altura de plantas, massa seca e o nitrogênio foliar na cultivar BMX Turbo, enquanto que na cultivar CD 250 houve redução na massa seca da parte aérea quando inoculada com bactérias diazotróficas. Bárbaro et al. (2009), em trabalho avaliando a inoculação padrão com *B. japonicum* e a co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* na cultura da soja, não observaram efeitos significativos na nodulação, massa seca da parte aérea, massa seca radicular e produtividade da soja.

Santos Neto et al. (2013) avaliando a adubação nitrogenada e a inoculação com *B. japonicum* constataram que a inoculação aumentou em aproximadamente 10% o rendimento da cultura da soja, enquanto que a adubação nitrogenada não apresentou diferença significativa para massa de cem sementes e produtividade. Já Bárbaro Torneli et al. (2018) avaliando inoculação e co-inoculação em sulco de semeadura, verificaram que a prática da

co-inoculação incrementou em 4,5 sacas ha⁻¹ e 7,62 sacas ha⁻¹ em relação a inoculação padrão com *B. japonicum* e a testemunha, respectivamente.

Essa inconsistência observada nos resultados obtidos em trabalhos envolvendo a inoculação de *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação, reforça a necessidade de novos estudos envolvendo essas bactérias, uma vez que são muitos fatores do ambiente que acabam influenciando no desempenho desses microrganismos na expressão do potencial produtivo da soja.

2.9 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. C. V. **A polêmica do uso de nitrogênio em soja**. Londrina: Revista online Doutores da Terra, 2015. Disponível em: <<http://www.doutoresdaterra.com.br/plantas/a-polemica-do-uso-de-nitrogenio-em-soja>>. Acesso em: 3 nov 2019.

ANDRADE, J. B.; BENINTENDE, R. P.; JUNIOR, E. F.; PAULINO, V. T.; HENRIQUE, W.; WERNER, J. C.; MATTOS, H. B. Efeitos das adubações nitrogenadas na produção e composição da forragem de *Brachiaria ruziziensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 617-620, 1996.

ANOLLÉS, C. G. Research Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. **Field Crops Research**, v. 53, p. 47-68, 1997.

ARAÚJO, C. S; **Fixação Biológica do Nitrogênio – importância de dois micronutrientes**. Valinhos: ANPII, 2013. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/fixacao-biologica-donitrogenio-importancia-de-dois-micronutrientes>>. Acesso em: 4 out 2019.

ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 356–362, 2007.

BÁRBARO, I. A.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; DA SILVA, J. A. A.; Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e coinoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 1- 7, 2009.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. **Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade**. [S. l.]: Infobilos, 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm>. Acesso em: 23 out 2019.

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; et al. **Avaliação de cultivares de soja no estado de São Paulo em resposta à aplicação de inoculantes no sulco de semeadura**. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AS CULTURAS DA SOJA E DO MILHO NO NOROESTE PAULISTA, 2018, Ituvera. Anais...Ituvera: Nucleus, 2018. p. 55-62.

BATTISTUS, A. G. **Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* associado ao tratamento de sementes com bioativador na cultura do milho**. 2015. 85 p. (Dissertação de mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2015.

BIZARRO, M. J. **Simbiose e variabilidade de estirpes de Bradyrhizobium associadas a cultura da soja em diferentes manejos de solo**. 2008. 107 f. (Tese Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; LIMA, L. H. S.; PICCININ, G. G. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999.

BULEGON, L. G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; MITIO INAGAKI, A. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, v. 34, n. 2, p. 169-176, 2016.

BURDMANN, S.; HAMAOU, B.; OKON, Y. Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. Israel: The Hebrew University of Jerusalem, 2000.

CÂMARA, G. M. S.; **Soja: A cultura da soja**. Piracicaba: O autor, 2015.

CARVALHO, F.G.D.; SELBACH P.A.; BIZARRO.; M.J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v 29, p 883- 891, 2005.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa: UFV, 2008. v. 2, p. 143-170.

CATUCHI, T. A.; VIEIRA, F.; GUIDORIZZI, C.; GUIDORIZZI, K. A. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 519–527, 2012.

CHUEIRI, W. A.; PAJARA, F.; BOZZA, D. Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja. **Manah: Divulgação técnica**, n 169. 2005.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2019.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, n. 2, p. 297–303, 2005.

DEAK, E.A. **Temperatura e umidade do solo na co-inoculação na cultura da soja**. 2017. 83p. (Dissertação mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

DOBEREINER, J.; BALDANI, I. J. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v.34, n. 7, p. 869-881, 1982.

DOMMELEN, V.A.; KEIJERS, A.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Methyl) amonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 10, p. 2652-2659, 1998.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

EMBRAPA. **Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2014. 1 p.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil**. Londrina, Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste: Fundação Meridional, 2005. 239p.

EMBRAPA. **Dados Econômicos**. Londrina: Embrapa soja, 2017. 1p.

EMBRAPA. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja: região central do Brasil 2001**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 46 p.

FAGAN, E. B., MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D. D.; LIER, Q. J. V.; SANTOS, O. S.; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 9 p.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Santa Fé: Agricultura, 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm>. Acesso: 10 out 2019.

FINOTO, E. L.; CORDEIRO JUNIOR, P. S.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; MARTINS, M. H.; SOARES, M. B. B.; MARTINS, A. L. M. Desenvolvimento e produção de soja co-inoculada com *Azospirillum brasilense* em semeadura direta sobre palhico de cana crua. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AS CULTURAS DA SOJA E DO MILHO NO NOROESTE PAULISTA, 2., 2017, Araçatuba. **Anais...Araçatuba: Nucleus**, 2017.

FRANDOLOSO, J.; DRANSKI, J. A. L.; JUNIOR, A. S. P.; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; RODRIGUES, L. F. S. O.; STETS, M. I.; ARAUJO, L. M.; CRUZ, L. M.; POZZEBOM, W. Efeito de Doses de Inoculante Líquido no Desempenho das Trocas Gasosas de dois Genótipos de Milho. In: XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO. 2012, Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia**: 2012.

GALVÃO, F. C. A. **Desempenho da cultura da soja sob diferentes recomendações de adubação: estudo de caso, fazenda Vereda, Cristalina – GO**. 2012. 56 f. Monografia Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

HIRAKURI, M., H.; LAZZAROTTO, J. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja**. Londrina: Embrapa soja, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001, 48 p.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (ISSN 1516-781X; n.325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (ISSN 1516-781X; n 283).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Netherlands: Springer, 2005. p. 25-42.

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, n.7, p.791- 801, 2013.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIIHL, R.A.S.; GARCIA, A. The use of the long-juvenile trait in breeding soybean cultivars. In. WORD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4, 1989, Buenos Aires. **Anais...**Buenos Aires: Agris, 1989. p. 994 – 1000.

KLEBA, J. B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 9-42, 1998.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V.M.; Efeito da adubação de da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.6, p.961-970,1998.

MATHESIUS, U.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAIK, H.P.; ROLFE, C.; DJORDJEVIC, M.A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. **The Plant Journal**, v.14, n.1, p.23-34, 1998.

MATTOS, M. **Promoção do crescimento de soja a partir da inoculação de sementes com microrganismos não moduladores**. 2017. 48 f. Monografia - Universidade federal da fronteira Sul, Cerro Largo, 2017.

MOREIRA F.; SIQUEIRA O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2 ed. Lavras: UFLA, 2006.

NETO, F. J. D. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1030–1040, 2013.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2003. 40p.

PASTORE, S.M.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, W.P.; SILVA, E.A.P.; VIANA, G.S.; MENDES, M.F.S.A.; ALVES, W.J.; IGLESIAS, E. Relação treonina: lisina digestíveis na dieta de poedeiras leves de 42 a 58 semanas de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.17, n.3, 2016.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125 n.1 p. 25-35, 2008.

- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125 n.1 p. 25-35, 2008.
- PEREG GERK, L.; GILCHRIST, K.; KENNEDY, I. R. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2175–84, 2000.
- REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, I. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 32, v. 1, p. 1139-1146, 2008.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEREDO, M. V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 196-202, 2012.
- RONSANI, A. L.; PINHEIRO, M. G.; PURIN, P. Efeitos de diferentes formulações e técnicas de inoculação no crescimento da soja. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. Florianópolis: SBCS, 2013.
- RYLE, G.J. A. et al. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.
- SANTOS, P.; SOUZA, P.; CARMONA, R.; SPEHAR, C.; VILLAS BÔAS, H. Semente é tecnologia. Especial Abrasem. **Agroanalysis**, p. 31-37, 2014.
- SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenaz, 2009. 314 p.
- SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BÓREM, F. **Soja: do plantio a colheita**. Viçosa: UFV, 2015.
- SOJA INOX. Parceria de sucesso. 2019. Disponível em: https://www.revistarural.com.br/Edicoes/2011/Artigos/rev163_soja_inox.htm Acesso em: 02 nov. 2019.
- SOUZA, P. J. O. P.; ORTEGA-FARIAS, S.; ROCHA, E. J. P.; SOUSA, A. M. L.; SOUZA, E. B. Consumo hídrico da soja no nordeste paraense. **Irriga**, v. Edição Esp, p. 218–231, 2016.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 24, p. 487-506, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- THOMAS, A.L.; COSTA, J.A. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: SOJA: **Manejo para alta produtividade de grãos**. Porto Alegre, p.113-126, 2010.
- TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279–290, 2012.
- USDA. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington D. C.: United States Department of Agriculture, 2019.

VARGAS, M.; MENDES, I.; CARVALHO, A.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUSA, D.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília: Embrapa, 2004, 416 p.

VIEIRA, F. C. F.; SANTOS JUNIOR, C. D.; NOGUEIRA, A. P. O.; DIAS, A. C. C.; 114 HAMAWAKI, O. T.; BONETTI, A. M. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por peg 6000. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 543–552, 2013.

VOSS, M.; CUNHA, M. H. Efeito da inoculação de estirpes recomendadas de Bradyrhizobium em soja, com população estabelecida dessa bactéria. In: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja: 1995/96**. Passo Fundo, p.209-213, 1996.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: na overview. **Plant and soil**, v. 284, n. 1, p. 3-14, 2006.

YU, G.R.; WANG, Q.F.; ZHUANG, J. Modeling the water use efficiency of soybean and maize plants under environmental stresses: application of a synthetic model of photosynthesis-transpiration based on stomatal behavior. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 303-318, 2004.

ZHANG, F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [Glycine max (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures. **Annals of Botany**, v.77, p.453 - 459, 1996.

ZHANG, S.; THOMAS, L.; WHITE MIRIAM, C.; MARTINEZ, J. A.; MCINROY, J. W.; KLOEPPER, K.W. Biological control of the potato dry rot caused by Fusarium species using PGPR strains. **Biological Control**, v. 53, p. 129-135, 2010.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; CAMPO, R. J.; GIANLUPI, V.; HUNGRIA, M. **Avaliação da fixação biológica de nitrogênio na soja em áreas de primeiro cultivo no cerrado de Roraima**. Roraima: Embrapa, 2006. 9 p. (Comunicado Técnico 20)

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F.; SILVA, L. O. Coinoculação de Bradyrhizobium japonicum e Azospirillum brasilense na cultura da soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 87-93, 2015.

CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E PRODUTIVAS DA SOJA INOCULADA E CO-INOCULADA COM *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense*

Resumo: O objetivo do trabalho foi estudar as características biométricas, componentes da produção e produtividade da cultura da soja cultivada em condições de vaso e a campo, sendo submetida à inoculação com as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. Foi utilizado delineamento em blocos ao acaso, com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *A. brasilense* via sementes e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições. Em condições de vaso, no estágio R₃, foram avaliados as características biométricas e os componentes da produção e a produtividade. Nas condições de campo, ao final do ciclo da soja, foram avaliadas as características biométricas além dos componentes da produção e a produtividade da cultura. No experimento em vasos foram observadas diferenças para a inoculação e co-inoculação para o diâmetro de coleto, número de nódulos por planta, massa seca de raiz e massa seca total. A campo, a altura das plantas e a produtividade foram afetadas pelo uso de *B. japonicum* e *A. brasilense* isolados e em co-inoculação. Diante dos resultados observados, pode-se concluir que a inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* e a co-inoculação, afetam positivamente as características biométricas em condição de vaso com incremento de 16% no diâmetro de coleto e 8% no número de nódulos. A co-inoculação elevou em 26% a massa seca de raiz e 24% a massa seca total, entretanto não afetaram os componentes da produção e produtividade da soja. Por outro lado, os tratamentos com *B. japonicum* aumentam em 31 % o rendimento da soja a campo.

Palavras chaves: *Glycine max*; bactérias promotoras de crescimento; fixação biológica de nitrogênio

3.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) teve origem no extremo Oriente, mais precisamente na região correspondente à China (CÂMARA, 2015). É uma das espécies cultivadas pelo homem de maior importância devido a sua qualidade nutricional (SEDIYAMA, 2009). Por ser fonte de proteínas é utilizada em larga escala para a formulação de ração animal, além de compor produtos destinados a alimentação humana (PASTORE, 2016).

O Brasil produziu 113 milhões de toneladas de soja na última safra, assumindo o segundo lugar na produção mundial da oleaginosa (CONAB, 2019). Diante da importância da soja para o país, a condução de novos estudos de práticas de manejo que maximizem o uso dos recursos disponíveis no ambiente produtivo, são cruciais para o país continuar sendo competitivo no mercado mundial, dentre as práticas pode se citar o uso das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.

A importância na utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio está relacionada à grande demanda do nutriente pela cultura. A soja necessita de aproximadamente 80 kg de nitrogênio para a produção de uma tonelada de grãos, uma vez que o elemento é constituinte de aminoácidos, proteínas e lipídeos (HUNGRIA et al., 2011). Na soja, o nitrogênio atmosférico é transformado em amônio por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (TAIZ; ZEIGER 2013). Essas bactérias se associam às plantas de soja formando nódulos em suas raízes, promovendo a quebra da tripla ligação do nitrogênio atmosférico, tornando-o prontamente disponível as plantas (FAGAN et al., 2007).

Essa simbiose pode suprir todo nitrogênio requerido pela oleaginosa, além de fornecer o elemento para a cultura subsequente (HUNGRIA et al., 2007). Esse processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das grandes vantagens do Brasil em relação a outros países produtores da oleaginosa, o que se deve pela redução dos custos em fertilizantes nitrogenados (VARGAS et al., 2004). Outro grupo de bactérias que são alvo de estudos na cultura da soja são as bactérias do gênero *Azospirillum*, as quais promovem a síntese de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, promovendo o crescimento do sistema radicular, favorecendo o crescimento da planta (NETO et al., 2013).

Outra técnica alvo de estudos é a co-inoculação, que busca aumentar a produtividade das áreas de soja. Essa técnica busca a obtenção do efeito sinérgico da combinação de microrganismos, buscando obter resultados produtivos superiores com a inoculação de ambos, em comparação a utilização dos microrganismos de forma isolada (BÁRBARO et al., 2008). Normalmente são usados inoculantes contendo *A. brasilense* juntamente com *B.*

japonicum. De acordo com Ferlini (2006), a utilização conjunta de bactérias fixadoras de nitrogênio juntamente com bactérias promotoras de crescimento, permite com que a soja tenha maior número de nódulos e o sistema radicular mais desenvolvido, aumentando a produtividade da cultura.

Os benefícios promovidos por essas bactérias tornam as plantas mais eficientes na utilização dos recursos do ambiente. A inoculação com *A. brasilense* proporciona maior desenvolvimento radicular, dessa forma além de melhorar o aproveitamento dos recursos do solo há um aumento nos sítios de infecção para o *B. japonicum*, uma vez que a associação dessa bactéria com a planta se inicia a partir dos pêlos radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2013) aumentando o fornecimento de nitrogênio via FBN para a cultura da soja (HUNGRIA, 2011) o que permite uma agricultura mais sustentável economicamente, ambientalmente e socialmente.

Diante dos benefícios que essas bactérias proporcionam ao desenvolvimento da soja, ensaios com avaliações biométricas e produtivas são importantes, com o intuito de elucidar a melhor forma de aplicação desses microrganismos maximizando a eficiência da interação entre a soja e as bactérias. Diante do que foi abordado, o estudo busca investigar os efeitos da inoculação e co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* nas variáveis biométricas, componentes da produção e rendimento da cultura da soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Experimento conduzido em vasos

O experimento foi implantado na estação de cultivo protegido “Professor Mario Cesar Lopes”, em Marechal Cândido Rondon - PR. O experimento foi conduzido no período compreendido entre os dias 15 de dezembro a 15 de abril, em delineamento de blocos ao acaso com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *A. brasilense* via sementes e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições, em duplicata totalizando 48 unidades experimentais. Isso foi realizado para efetuar as análises destrutivas.

Foram utilizados vasos de 8 dm³, sendo o solo utilizado como substrato não esterilizado para a implantação do experimento. O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), com as seguintes características químicas na camada de 0-20 cm: P = 13,19 mg dm⁻³; MO = 49,21

g dm^{-3} ; $\text{pH (CaCl}_2) = 6,37$; $\text{H+Al} = 2,54 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{Al}^{+3} = 0,00 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{K}^+ = 1,56 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{Ca}^{2+} = 8,78 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{Mg}^{2+} = 3,46 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{CTC} = 16,34 \text{ cmolc dm}^{-3}$; $\text{V\%} = 84,46$.

O solo foi fertilizado utilizando a recomendação de adubação para experimentos em vasos, fornecendo: 200 kg ha^{-1} de N, na forma de uréia, 300 kg ha^{-1} de K na forma de cloreto de potássio e 600 kg ha^{-1} de P na forma de super fosfato simples, o que adicionou 8 kg ha^{-1} de S e 17 kg ha^{-1} de Ca (NOVAES et al., 1991). Regas diárias foram efetuadas até que os vasos atingirem a capacidade de campo, suprimindo a demanda de água em todas as fases de desenvolvimento da cultura, desde a germinação das sementes até o momento em que a cultura atingiu a maturação fisiológica.

Os dados meteorológicos de umidade relativa e temperatura, durante a condução do experimento em vasos em Marechal Cândido Rondon – PR, são apresentados na figura 1.

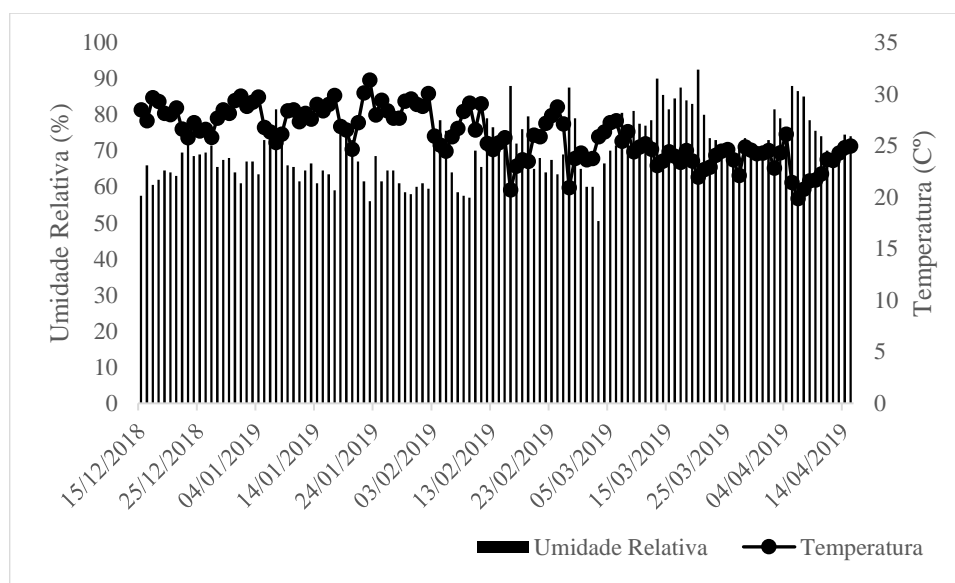


Figura 1: Condição de umidade relativa e temperatura durante a condução do experimento em cultivo protegido. Barras indicam a umidade relativa e linha horizontal indica as temperaturas. Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019.

Antes da semeadura, as sementes de soja da cultivar Monsoy 5947 Ipro foram inoculadas com as bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, através de agitação vigorosa em sacos de polietileno. As sementes também foram tratadas com inseticida (Standak top® 200 mL 100 kg^{-1} de sementes) visando o controle de pragas que atacam plântulas de soja. O

procedimento da inoculação e co-inoculação das bactérias foi realizada duas horas antes da semeadura e mantidas à sombra em temperatura amena.

Foram utilizados inoculantes líquidos da Empresa NITRO1000 Inoculantes Biológicos LTDA, contendo *B. japonicum*, com concentração de 2×10^9 UFC mL⁻¹ (estirpes 5079 e 5080) e *A. brasilense* (estirpes AbV5 e AbV6) com 2×10^8 UFC mL⁻¹. As doses utilizadas para os inoculantes foram de acordo com as recomendações da empresa para a inoculação via semente, sendo utilizados 100 mL por 50 kg de sementes. Em cada vaso foram semeadas 6 sementes de soja à profundidade de 4 cm e após a emergência e desenvolvimento das folhas cotiledonares foi realizado desbaste permanecendo apenas duas plantas em cada vaso.

Quando a soja atingiu o estágio R₃ foram efetuadas as análises biométricas, onde foram coletadas duas plantas de cada parcela, avaliando altura de planta com auxílio de uma régua graduada e diâmetro basal do caule com paquímetro digital. Posteriormente, as plantas foram separadas em folhas e caule + pecíolo, acondicionadas em sacos de papel kraft e levadas à estufa de circulação forçada de ar para secagem a 65 °C, por 72 h, até atingir de massa constante, sendo então pesadas em balança de precisão para obtenção da massa seca.

As raízes foram retiradas dos vasos, lavadas em água corrente e secadas à sombra. Em seguida foi determinado o número de nódulos e a massa de nódulos por planta e a massa seca de raízes, após secagem em estufa de circulação forçada de ar conforme descrito para a matéria seca dos órgãos. A massa seca total foi obtida pela soma dos valores de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz mais nódulos. No final do ciclo produtivo foram avaliados o número de vagens por planta, número de grãos por vagens, massa de mil grãos e produção por planta.

Os dados foram submetidos a análise de variância, e quando apresentaram 95% de significância, as médias foram comparados por teste de Tukey a 95 % de nível de confiança com auxílio do software estatístico SISVAR versão 5.1, build 72 (FERREIRA, 2011).

3.2.2 Experimentos conduzidos a campo

Foram conduzidos dois ensaios sendo um no município de Marechal Cândido Rondon em uma propriedade particular e outro na fazenda experimental “Professor Alcebíades Luís Orlando”, em Entre Rios do Oeste – PR. Os experimentos foram implantados em delineamento de blocos ao acaso, com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *Azospirillum brasilense* via

sementes e Co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições, totalizando 24 parcelas.

Em Marechal Cândido Rondon a soja foi semeada em 05/10/2018, sobre os restos culturais do milho. As parcelas foram constituídas por sete linhas com 10 metros de comprimento com espaçamento de 0,45 metros, onde que a área útil correspondente ao centro de cada parcela foi de 9,45 m². A cultivar de soja utilizada foi a Monsoy 5947 Ipro, onde foram semeadas 12 sementes por metro linear, com 300 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 4-30-10 seguindo a análise do solo de acordo com recomendações do manual de adubação e calagem para o estado do Paraná (PAVINATO, 2017).

O solo da área de Marechal Cândido Rondon é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), com as seguintes características químicas na camada de 0-20 cm: P = 13,19 mg dm⁻³; MO = 49,21 g dm⁻³; pH (CaCl₂) = 6,37; H+Al = 2,54 cmolc dm⁻³; Al³⁺ = 0,00 cmolc dm⁻³; K⁺ = 1,56 cmolc dm⁻³; Ca²⁺ = 8,78 cmolc dm⁻³; Mg²⁺ = 3,46 cmolc dm⁻³; CTC = 16,34 cmolc dm⁻³; V% = 84,46.

As condições meteorológicas de precipitação e temperatura durante a condução do experimento em Marechal Cândido Rondon- PR são apresentadas na figura 2.

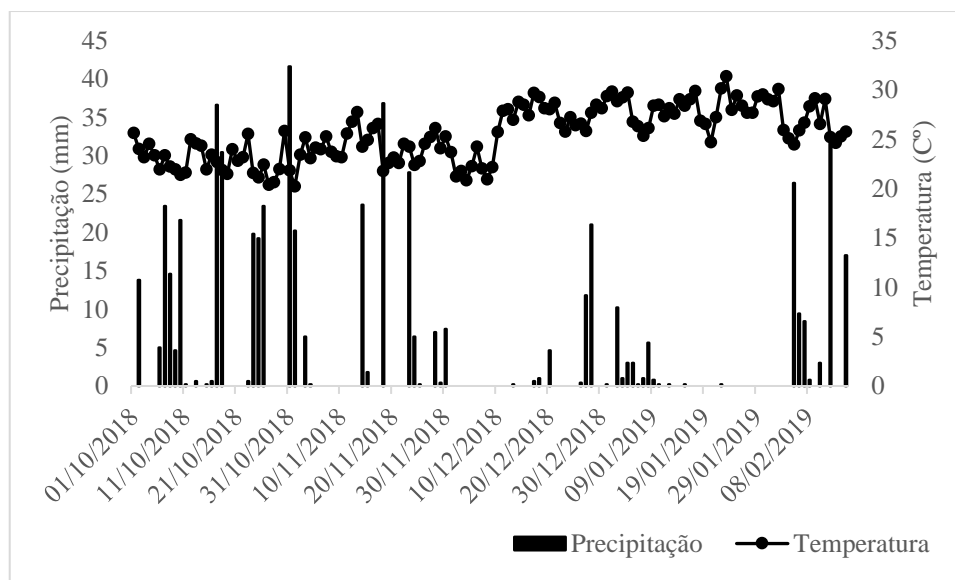


Figura 2: Condição de precipitação e temperatura durante a condução do experimento á campo. Barras indicam as precipitações e linha horizontal indica as temperaturas. Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019.

Em Entre Rios do Oeste, a semeadura da soja foi realizada em 10/10/2018 sobre os restos culturais do milho. As parcelas foram constituídas por 5 linhas com 10 metros de comprimento com espaçamento entre linha de 0,50 metros, sendo o centro da parcela definido como a área útil, o que representa 9 m². A cultivar de soja utilizada foi a Monsoy 5947 Ipro, onde foram semeadas 13 sementes por metro linear e 290 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 2-20-18 de acordo com análise de solo seguindo o manual de adubação e calagem para o estado do Paraná (PAVINATO, 2017).

O solo da área de Entre Rios do Oeste é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), com as seguintes características químicas na camada de 0-20 cm: P = 16,18 mg dm⁻³; MO = 15,72 g dm⁻³; pH (CaCl₂) = 4,76; H+Al = 7,45 cmolc dm⁻³; Al⁺³ = 0,32 cmolc dm⁻³; K⁺ = 0,43 cmolc dm⁻³; Ca²⁺ = 2,85 cmolc dm⁻³; Mg²⁺ = 0,72 cmolc dm⁻³; CTC = 3,99 cmolc dm⁻³; V% = 50,10%.

As condições meteorológicas de precipitação e temperatura durante a condução do experimento em Entre Rios do Oeste- PR são apresentadas na figura 3.

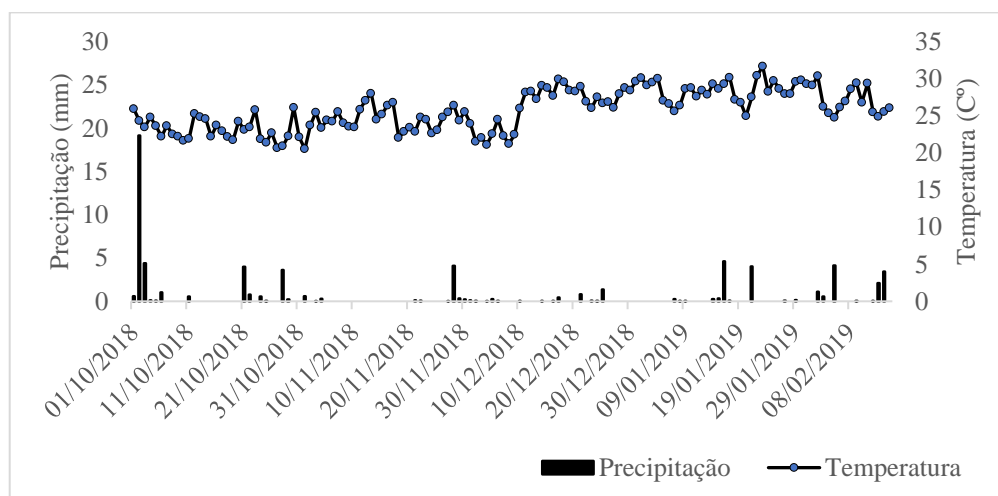


Figura 3: Condição de precipitação e temperatura durante a condução do experimento á campo. Barras indicam as precipitações e linha horizontal indica as temperaturas em Entre Rios do Oeste, Paraná, 2018 – 2019.

A inoculação e co-inoculação das bactérias do experimento foi realizada duas horas antes da semeadura e mantidas à sombra em temperatura aproximada de 25 °C. Foram utilizados inoculantes líquidos da Empresa NITRO1000 Inoculantes Biológicos LTDA, contendo *B. japonicum* com 2x10⁹ UFC mL⁻¹ (estirpes 5079 e 5080) e *A. brasilense* com 2x10⁸ UFC mL⁻¹ (estirpes AbV5 e AbV6). As doses utilizadas para os inoculantes foram de

acordo com as recomendações da empresa para a inoculação via semente, sendo utilizados 100 mL por 50 kg de sementes. As sementes também foram tratadas com inseticida (Standak top® 200 mL 100 kg⁻¹ de sementes).

Durante a condução dos experimentos a campo, foram realizadas práticas de manejo visando o controle das plantas daninhas através do uso de herbicida contendo glifosato (2000 mL/ha). Para o manejo das doenças da soja, foram realizadas aplicações de fungicidas contendo triazól, estrobilurina e carboxamida (400mL/ha). Para o manejo dos percevejos foram utilizados inseticidas contendo imidacloprido e cipermetrina (1000 mL/ha).

Ao final do ciclo da cultura, foram determinados os componentes da produção e produtividade da cultura. Para as determinações de componentes da produção foram coletadas 10 plantas aleatoriamente dentro da área útil, avaliando-se a altura de inserção da primeira vagem, o número de vagens por planta, a massa de mil grãos. Para a produtividade colheu-se a área útil de cada parcela sendo os dados extrapolados para kg ha⁻¹.

Os dados foram submetidos a análise de variância, e quando apresentaram 95% de significância, as médias foram comparados por teste de Tukey à 95 % de nível de confiança com auxílio do software estatístico SISVAR versão 5.1, build 72 (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Experimento conduzido em vasos

Considerando a análise de variância baseada nos quadrados médios, constata-se que houve diferença entre os tratamentos com inoculação para as variáveis massa seca de raízes, massa seca total, número de nódulos e diâmetro de coleto (Tabela 1). Para as variáveis altura de plantas, massa seca da parte aérea, número de nódulos e massa de nódulos não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 1: Valores médios de altura de planta, diâmetro de coleto, número de nódulos, massa seca de nódulos (MSN), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

	Altura	Diâm.	n° nódulos	MSN	MSPA	MSR	MST
Tratamento	(cm)	(mm)	(n°/planta)				(g)
Testemunha	69,9 ^{ns}	7,7b	233,3b	1,3 ^{ns}	26,1 ^{ns}	9,3b	36,7b
<i>B. japonicum</i>	72,1	9,1a	250,3a	1,4	31,4	10,5ab	43,4ab
<i>A. brasilense</i>	72,8	8,3ab	252,1a	1,4	27,9	10,6ab	39,8ab
Co-inoculação	71,1	9,2a	239,5b	1,3	32,5	11,8a	45,6a
C.V (%)	11,2	8,3	1,9	8,7	13,6	13,3	11,8
DMS	12,9	1,1	9,4	0,2	6,5	2,3	7,5

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo

Analisando a altura de plantas, massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea percebe-se que as mesmas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, considerando as formas de inoculação de *B. japonicum*, *A. brasilense*, co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* e a testemunha.

A ausência de respostas para a inoculação com *B. japonicum* para as variáveis analisadas, pode estar relacionada a população adequada de bactérias no substrato, o que permite um aporte adequado de nitrogênio via FBN para todos os tratamentos, uma vez que maiores respostas a inoculação geralmente ocorrem quando o substrato apresenta populações baixas de *Bradyrhizobium*, sendo possível a visualização de respostas entre a inoculação e a testemunha (PAVANELLI; ARAÚJO, 2009).

Por outro lado, a inoculação com *A. brasilense* pode gerar resultados variados, o que se deve ao fato desse grupo de bactérias sofrer a ação de fatores externos do solo, como a competição com outras bactérias pelos recursos do solo, o que limita as respostas da planta (BALDANI et al., 1997).

No caso da co-inoculação, em muitos casos a ausência de respostas pode estar relacionada a competição entre as bactérias, uma vez que a utilização de mais de uma espécie de microrganismos no tratamento de sementes pode reduzir a colonização radicular desses microrganismos, pois o *B. japonicum* e *A. brasilense* acabam competindo pelos mesmos sítios de infecção na planta, resultando em uma infecção menos eficiente em relação a inoculação dos microrganismos realizada de forma isolada (PLAZISKI; ROLFE, 1985).

Muitos trabalhos demonstram essa inconsistência nos resultados devido a utilização de *B. japonicum* e *A. brasilense*. Mauricio filho et al. (2018) e Neto (2019) não encontraram respostas significativas para a inoculação e co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* na altura da soja. Bárbaro et al. (2009), atribuem a ausência de resultados significativos para as variáveis altura de plantas, massa seca de nódulos, e massa seca da parte aérea a alta população de *B. japonicum* presente no solo, uma vez que um substrato com uma população adequada da bactéria permite com que todos os tratamentos tenham sua demanda de nitrogênio suprida via FBN, resultando em menores respostas em comparação a um solo com uma baixa população natural de *B. japonicum*.

Para a massa seca de raízes e massa seca total os tratamentos com co-inoculação foram superiores a testemunha, entretanto não diferindo dos tratamentos com a inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*. Apesar da testemunha ter apresentado valores na ordem de 26,88% menos massa seca de raiz e 24,25% menos massa seca total em relação a co-inoculação, a testemunha foi semelhante aos tratamentos com a inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*.

Apesar da massa seca total da soja apresentar incremento significativo em função da co-inoculação, a parte aérea das mesmas não foi significativo, onde o aumento da massa seca total das plantas de soja em função da co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* está atrelado ao maior desenvolvimento do sistema radicular.

O maior desenvolvimento do sistema radicular que resulta em maior matéria seca total de plantas, em função da co-inoculação se deve ao sinergismo da utilização de ambas as bactérias, onde ocorre maior desenvolvimento radicular e fixação de nitrogênio em comparação a testemunha, resultado dos efeitos benéficos da co-inoculação de *A. brasilense* e *B. japonicum* no tratamento das sementes.

O aumento do desenvolvimento do sistema radicular está relacionado ao efeito bioregulador promovido pelos efeitos do uso de *A. brasilense* junto as sementes (PEDRAZA, 2008), o qual está relacionado a biossíntese de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (BASHAN et al., 2004). Bashan e Holguin (1997) atribuem o maior crescimento das plantas e do sistema radicular, principalmente ao ácido indol-acético (AIA) em plantas inoculadas com *A. brasilense*.

Outro efeito promovido pelo *A. brasilense* está relacionado a síntese de óxido nítrico, molécula responsável pela formação de raízes e pelos radiculares (CREUS et al., 2005), aumentando a área do sistema radicular, permitindo maior absorção de água e nutrientes além de permitir maior colonização da rizosfera pelo *B. japonicum*.

Por outro lado, quando se realiza a co-inoculação de *B. japonicum* com *A. brasilense*, pode ocorrer incrementos na atividade da leghemoglobina e da simbiose com a soja, o que permite a antecipação da fixação biológica de nitrogênio (DASHTI et al., 1998), sugerindo que ocorre uma maior atividade dos nódulos (HUNGRIA, 2011), contribuindo para maior aporte de nitrogênio na planta favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular (TAIZ, ZEIGER, 2013).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por Finoto et al. (2017), que observaram aumento na massa seca total e massa seca de raízes em função da co-inoculação, sendo os incrementos atribuídos aos benefícios da utilização conjunta das bactérias, onde que o *A. brasilense* promove maior desenvolvimento das plantas em função da capacidade da bactéria em produzir auxinas, giberelinas e citocininas (MASCIARELLI et al., 2013), aliado ao efeito da maior nodulação em função da bactéria *B. japonicum*, permitindo maior aporte de nitrogênio para a planta (FERLINI, 2006), favorecendo o crescimento radicular e incrementando nos valores de matéria seca da soja.

Quanto a massa seca da parte aérea e a massa seca de nódulos, a ausência de respostas para a inoculação com *B. japonicum* pode estar relacionada a população adequada da bactéria no substrato (PAVANELLI, ARAÚJO, 2009), permitindo que todos os tratamentos tenham sua demanda de N atendida de maneira semelhante via FBN. Para a inoculação de *A. brasilense* e a co-inoculação a ausência de respostas pode estar associada a presença de microrganismos no substrato que acabam competindo com as bactérias utilizadas no tratamento de sementes (BALDANI et al., 1997; PLAZISKI, ROLFE, 1985), impactando de forma negativa na expressão de resultados dos tratamentos.

Apesar da ausência de resultados significativos para a massa seca de nódulos, os valores encontrados no presente estudo mostram nodulação adequada para a soja, uma vez que valores situados entre uma e duas gramas por planta, são suficientes para garantir o fornecimento de nitrogênio requerido pela soja para seu desenvolvimento (HUNGRIA, 2007).

Para o diâmetro de coleto foram verificadas diferenças entre os tratamentos e a testemunha. Os tratamentos que receberam a inoculação com *B. japonicum* e a co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* apresentaram diâmetro de coleto aproximadamente 16% superiores a testemunha, no entanto, a inoculação das sementes apenas com *A. brasilense* não apresentou diferença significativa para a testemunha e as formas de inoculação.

O diâmetro é uma característica importante para a soja, uma vez que plantas com maior diâmetro de coleto são mais tolerantes ao acamamento, reduzindo as perdas de

produtividade da soja, pois plantas acamadas apresentam abscisão de estruturas reprodutivas como flores e vagens e redução do enchimento de grãos decorrente do auto sombreamento, além de dificultar o processo de colheita das plantas acamadas (BULEGON et al., 2016).

Diante da importância do diâmetro de coleto da soja, a co-inoculação mostra-se como uma alternativa para os produtores, reduzindo as perdas advindas do acamamento. O aumento do diâmetro de coleto pela co-inoculação se deve ao efeito sinérgico advindo das substâncias promotoras de crescimento sintetizadas pelo *A. brasilense*, como auxinas, giberelinas e citocininas (NETO et al., 2013) aliado a maior fixação de nitrogênio devido a inoculação de *B. japonicum*.

Quando se utiliza *A. brasilense* há um melhor aproveitamento de água e nutrientes disponíveis no solo, uma vez que sua utilização favorece o desenvolvimento radicular pela síntese de fitohormônios (PEDRAZA, 2008), aumentando da utilização dos recursos disponíveis no solo incrementando o diâmetro de coleto da soja. Já o uso de *B. japonicum* está relacionado a maior atividade da enzima nitrogenase, indispensável para a FBN (PESSOA, 2008) resultando em maior aporte de nitrogênio para as plantas de soja.

Bactérias fixadoras de nitrogênio possuem a capacidade de quebrar a ligação tripla do N atmosférico, tornando o disponível as plantas (MALAVOLTA, 2006). Dessa forma, tratamentos que receberam *B. japonicum*, tanto de forma isolada como em co-inoculação, tem sua demanda por nitrogênio atendida, o que proporciona incremento no diâmetro das plantas. Isso se deve ao fato do nitrogênio atuar como componente da estrutura de moléculas e enzimas que são responsáveis pelo desenvolvimento das plantas (MALAVOLTA, 2006) atuando diretamente na fotossíntese, o que incrementa a produção de fotoassimilados, e promove aumento significativo na taxa de crescimento das estruturas das plantas, incluindo o coleto da soja (TAIZ, ZEIGER., 2013).

Para o número de nódulos, observa-se que a testemunha e o tratamento com co-inoculação foram semelhantes entre si. No entanto, os tratamentos que receberam a inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* foram semelhantes entre si, mas com maior nodulação em relação a testemunha e a co-inoculação na ordem de 8 e 7%, respectivamente.

Plazinski; Rolfe (1985), ressaltam que a co-inoculação de diferentes microrganismos no tratamento das sementes pode reduzir a atividade de colonização radicular pela competição entre as bactérias. Entretanto a co-inoculação pode apresentar resultados variados, podendo estimular ou prejudicar a nodulação, sendo influenciada pelo tipo de inóculo presente no solo e o tipo de inoculação (FERLINI, 2006). Portanto, a utilização da técnica da co-inoculação e as formas de aplicação ainda demandam estudos, com o intuito

de esclarecer a melhor forma de uso dessa técnica, objetivando explorar esses microrganismos de maneira eficiente.

Por outro lado, quando se adiciona apenas *A. brasilense*, há um aumento na quantidade de pêlos radiculares (CASSÁN et al., 2009), aumentando a área do sistema radicular e dos sítios de ligações e nodulação (RODRIGUES et al., 2012), resultando em um aumento na nodulação da soja apenas com a população de *B. japonicum* presente no solo. Alguns autores ainda apontam que além do aumento no número de nódulos o uso de *A. brasilense* pode aumentar a viabilidade dos nódulos (BATTISTUS et al., 2016)

Já o aumento no número de nódulos em função da inoculação com *B. japonicum* no tratamento de sementes, se deve a associação das bactérias e os pêlos radiculares, resultando na formação dos nódulos, sendo os mesmos formados a partir do enovelamento dos pêlos radiculares em função de estímulos hormonais resultantes desse grupo de microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quando se considera a análise de variância baseada nos quadrados médios para o experimento conduzido em vasos, verifica-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com inoculação para as variáveis número de vagens, grãos por vagem massa de cem grãos e produção por planta (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios para número de vagens, grãos por vagem, massa de cem grãos e produção por plantas da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

Tratamento	n° vagens	Grãos/vagem	Massa de cem grãos (g)	Produção (g/planta)
Testemunha	27,20 ^{ns}	2,72 ^{ns}	12,65 ^{ns}	9,14 ^{ns}
<i>B. japonicum</i>	28,53	2,74	12,90	9,80
<i>A. brasilense</i>	26,80	2,72	12,80	9,30
Co-inoculação	28,00	2,74	12,77	9,77
C.V (%)	8,64	0,99	2,71	8,69
DMS	3,97	0,04	0,58	1,37

ns: não significativo.

Como verificado na tabela 2 os tratamentos com inoculação não influenciaram significativamente nos componentes de produção no experimento em vasos. Possivelmente a ausência de resultados se deve a área limitada dos vasos, onde os recursos disponíveis no

substrato são semelhantes para todos os tratamentos o que acaba não impactando nos componentes da produção.

Outro motivo para a ausência de respostas para os componentes de produção, pode estar relacionado ao fato da cultivar utilizada não ser tão responsiva a utilização desses microrganismos. Bulegon et al., (2016) em estudo envolvendo a inoculação e a co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em duas cultivares de soja, concluíram que os genótipos apresentam capacidade distinta de respostas, onde uma das cultivares apresentou maiores respostas para as variáveis biométricas e os componentes da produção.

Para a co-inoculação, a competição entre os microrganismos utilizados conjuntamente nas sementes pode explicar a ausência de respostas para as variáveis (PLAZINSKI; ROLFE, 1985). Já a falta de respostas a inoculação com *B. japonicum*, pode estar relacionada a população adequada das bactérias no substrato, onde todos tratamentos tem a sua demanda por N suprida via FBN (PAVANELLI; ARAÚJO, 2009).

Resultados semelhantes ao do estudo foram obtidos por Bulegon et al., (2016) que não observaram diferenças para os tratamentos nas variáveis número de vagens e grãos por vagem, onde a ausência de resultados possivelmente ocorreu por essa característica ser constante nas cultivares de soja devido ao melhoramento genético, por isso da ausência de efeitos.

Para massa de cem grãos e produção por planta, Luz (2018) também observou que a inoculação e co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*, não influenciou no número de vagens, massa de mil grãos e produtividade.

3.3.2 Experimentos conduzidos a campo

Observando a análise de variância baseada nos quadrados médios no experimento conduzido em Marechal Cândido Rondon, verifica-se que houve diferença entre os tratamentos com inoculação para as variáveis altura de plantas e produtividade (Tabela 3). Para as variáveis inserção de vagens, número de vagens e massa de mil grãos não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 3: Valores médios de altura de planta, inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos em plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

	Altura	Ins.vag.	n° vag.	Massa de mil grãos	Produtividade
Tratamento	(cm)	(cm)	-	(g)	(Kg ha ⁻¹)
Testemunha	64,30b	10,80ns	52,25ns	158,72ns	2523,67b
<i>B. japonicum</i>	70,32a	10,87	57,13	161,56	3312,59a
<i>A. brasilense</i>	68,93a	11,12	50,65	160,53	2516,67b
Co-inoculação	72,77a	11,23	53,75	160,64	2923,33ab
C.V (%)	3,98	7,81	10,07	1,59	13,40
DMS	4,44	1,39	8,70	4,13	610,97

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Analisando a altura de plantas de soja em Marechal Cândido Rondon submetidas a inoculação e co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*, observa-se que os tratamentos incrementaram na altura das plantas em comparação a testemunha. Quando se analisa os tratamentos inoculação com *B. japonicum*, inoculação com *A. brasilense* e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* constata-se incrementos na altura de plantas de 9,36, 7,02 e 13,13% respectivamente, quando comparados a testemunha.

Para a produtividade a testemunha não diferiu significativamente da inoculação com *A. brasilense* e da co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense*, sendo que a co-inoculação não apresentou diferença em comparação a inoculação com *B. japonicum*.

Por outro lado, a inoculação com *B. japonicum* foi superior a testemunha e a inoculação com *A. brasilense*. A inoculação de *B. japonicum* promoveu incrementos de 788 Kg ha⁻¹ em relação a testemunha e 795 Kg ha⁻¹ em comparação a inoculação com *A. brasilense* o que representa ganhos de aproximadamente 31% no rendimento de grãos. Já para as variáveis inserção de vagens, número de vagens e massa de mil grãos não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com a inoculação e co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em relação a ausência de inoculação.

Ao considerar a análise de variância baseada nos quadrados médios para o experimento na cidade de Entre Rios do Oeste, verifica-se que houve diferença entre os tratamentos com inoculação para a variável altura de plantas (Tabela 4). Para a inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 4: Valores médios de altura de planta, inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos em plantas de soja da variedade Monsoy 5947 IPRO, submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e testemunha sem inoculação, em Entre Rios do Oeste, Paraná, 2019.

	Altura	Ins.vag.	nº vag.	Massa de mil grãos	Produtividade
Tratamento	(cm)	(cm)	-	(g)	(Kg ha ⁻¹)
Testemunha	68,08b	10,80ns	51,83ns	143,08ns	2287,77ns
<i>B. japonicum</i>	71,56a	11,26	57,25	145,67	2624,81
<i>A. brasilense</i>	69,38a	11,21	50,73	144,64	2607,04
Co-inoculação	73,60a	11,52	54,02	145,05	2618,52
C.V (%)	5,31	9,84	10,62	1,64	11,78
DMS	5,96	1,78	9,18	3,84	482,60

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo

A inoculação e co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* aumentaram a altura das plantas em comparação a testemunha. Quando se analisa os tratamentos inoculação com *B. japonicum*, inoculação com *A. brasilense* e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* constata-se incrementos na altura de plantas de 5, 2 e 8% respectivamente, quando comparados a testemunha. No entanto para as variáveis inserção de vagens, número de vagens, produtividade e massa de mil grãos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

O aumento na altura das plantas, com a inoculação de *A. brasilense* está relacionado a maior nutrição das plantas de soja, uma vez que essas bactérias são capazes de sintetizar substâncias reguladoras de crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e citocininas (PEDRAZA, 2008) que favorecem o desenvolvimento radicular, resultando em mais absorção de água e nutrientes, promovendo maior crescimento das plantas inoculadas (NETO et al., 2013).

A utilização de *A. brasilense* também favorece parâmetros fisiológicos das plantas, podendo aumentar os teores de clorofila nas folhas, promover maior condutância estomática, além de aumentar os teores de água nas plantas, resultando em maior elasticidade nos tecidos das plantas permitindo maior crescimento das plantas inoculadas (BARASSI et al. 2008).

Quando se consideram os incrementos na altura de plantas em ambas localidades e os incrementos na produtividade da soja em Marechal Cândido Rondon quando se realizou a inoculação com *B. japonicum*, os resultados são atrelados aos benefícios provenientes da fixação de nitrogênio, onde essas bactérias promovem a quebra da tripla ligação no N

atmosférico tornando o disponível as plantas (FAGAN et al., 2007). Nas plantas o elemento compõe moléculas e enzimas (MARCHNER, 1995), influenciando na produção de fotoassimilados essenciais para o crescimento das plantas, pois atua na fotossíntese (ANDRADE, 1996), resultando em incrementos nos teores de proteínas, aumentando a produtividade da soja (FAGAN et al., 2007).

Resultados semelhantes aos obtidos nos experimentos a campo foram encontrados por Finoto et al. (2017), onde observaram que a co-inoculação e a inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* incrementaram a altura de plantas em comparação a testemunha. Quanto a produtividade os autores constataram que a inoculação apenas com *B. japonicum* aumentou o rendimento da soja. Bárbaro et al. (2009), também observaram que plantas de soja co-inoculadas e a inoculação padrão com *B. japonicum* foram semelhantes, corroborando com os resultados para produtividade do experimento em Marechal Cândido Rondon.

O *A. brasilense* estimula a produção de hormônios promotores de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas, que favorecem o desenvolvimento radicular, crescimento das plantas e consequente aumento no rendimento da soja (MASCIARELLI et al., 2013). Diante de um sistema radicular mais desenvolvido, ocorre maior infecção por *B. japonicum* (RODRIGUES et al., 2012), contribuindo com maior aporte de nitrogênio para a soja, o que explica, os bons resultados para produtividade em função da co-inoculação

Maiores respostas para o aumento do rendimento de grãos quando se utiliza *B. japonicum* normalmente são encontradas em solos com populações mais baixas da bactéria. A inoculação nessas situações promove ganhos significativos na produtividade em função do maior fornecimento de nitrogênio para as plantas. Por outro lado, um solo com alta população de *B. japonicum* consegue suprir a demanda do elemento sem a necessidade da inoculação (FINOTO et al., 2017).

A inoculação resulta em um aumento de bactérias viáveis para colonizar as raízes, dessa forma há um aumento na nodulação pela associação das bactérias e os pêlos radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2013). Maior número de nódulos contribui com o fornecimento de nitrogênio para a planta, sendo o nitrogênio crucial para a produtividade, pois eleva os níveis de proteína nos grãos, participando das principais reações bioquímicas da planta, sendo constituinte de inúmeros compostos como enzimas, coenzimas, pigmentos fotossintéticos e proteínas (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Por outro lado, a ausência de respostas quando se utiliza *A. brasilense* pode estar relacionado a eficiência do *B. japonicum* no processo de FBN, ou até mesmo a competição

com outros microrganismos nativos do solo (LUZ, 2018). Para que haja bons resultados envolvendo o uso de *A. brasilense*, a bactéria deve ser capaz de competir com as bactérias diazotróficas nativas do solo, visando um alto número de bactérias viáveis. Já a ausência de respostas para a co-inoculação se deve a competição entre as bactérias no tratamento de sementes (PLAZINSKI; ROLFE, 1985) ajudando a explicar a ausência de resultados.

A ausência de resultados significativos, principalmente em Entre Rios, onde não foi observado influência dos tratamentos no rendimento da soja e demais variáveis, exceto para altura de plantas, pode ser explicada pela falta de calagem na área, uma vez que a área apresentou pH de 4,76. A acidez elevada, em situações de pH menor que 5,5 é recomendado utilizar o dobro da dose de inoculante, uma vez que a acidez causa a mortalidade dos microrganismos (CHUEIRI et al., 2005).

Além de influenciar na sobrevivência dos microrganismos, a acidez interfere negativamente no crescimento do sistema radicular da soja. Tendo em vista que os maiores benefícios da inoculação ocorrem pela interação das bactérias com o sistema radicular, solos ácidos vão limitar drasticamente o processo de infecção por microrganismos benéficos a cultura como é o caso do *B. japonicum* e o *A. brasilense*, além disso plantas com um sistema radicular menos desenvolvido vão aproveitar menos os recursos disponíveis no solo

O déficit hídrico ocorrido durante a condução do experimento, principalmente nos estádios reprodutivos é outro motivo que explica a ausência de respostas produtivas em Entre Rios do Oeste (Figura 3). A maior demanda hídrica da soja ocorre nas fases reprodutivas, onde a demanda diária pode chegar a 7 mm (SOUZA et al., 2016). É na fase reprodutiva que a soja define os componentes de rendimento (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007), e a falta de água resultou no abortamento de estruturas reprodutivas, abscisão de folhas e redução na massa de grãos (VIEIRA et al., 2013), impactando negativamente na produtividade.

3.4 CONCLUSÕES

A utilização de *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação no tratamento de sementes promove maior crescimento das plantas, incrementando 16% o diâmetro de coleto, 8% o número de nódulos, 26% a massa seca de raiz e 24% massa seca total da soja.

A inoculação e co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* não afeta significativamente os componentes da produção e a produtividade da cultura da soja em condições de vaso.

A inoculação com *B. japonicum* incrementa em 31% a produtividade da cultura da soja em condições de campo em solo de alta fertilidade.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. B.; BENINTENDE, R. P.; JUNIOR, E. F.; PAULINO, V. T.; HENRIQUE, W.; WERNER, J. C.; MATTOS, H. B. Efeitos das adubações nitrogenadas na produção e composição da forragem de *Brachiaria ruziziensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 617-620, 1996.

BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 01-07. 2009.

BALDANI, J. L.; CARUSO, V. L. D.; BALDANI, S. R.; J. DÖBEREINER. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil biology biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BASHAN, Y.; G. HOLGUIN. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BARASSI, M. R.; COLE, M. A.; ELLIOTT, R. J. R. Stochastic Divergence or Convergence of Per Capita Carbon Dioxide Emissions: Re-examining the Evidence. **Environ Resource Economics**, v. 40, p. 121-137, 2008.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; EGEWARTH, V. A.; SANTOS, M. G.; HELING, A. L.; FERREIRA, S. D.; WENGRAT, A. P. G. S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, v. 4, n. 5, p. 277-286, 2016.

CÂMARA, G.M.S. **Soja: A cultura da soja**. Piracicaba: O autor, 2015.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos**. Safra 2018/2019, sétimo levantamento. 2019.

CHUEIRI, W. A.; PAJARA, F.; BOZZA, D. Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja. **Manah: Divulgação técnica**, n 169. 2005.

CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense* - induced Lateral Root Formation in Tomato. **Planta**, v. 221, n. 2, p. 297–303, 2005.

DASHTI, N. Plant growth promotion rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean. [*Glycine max.* (L.) Merr.] under short season conditions. **Plant and Soil The Hague**, v. 200, n. 2, p.205-213, 1998.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília/ Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005.

FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q.D. J.V.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 9 p.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Santa Fé: Agricultura, 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm>. Acesso: 10 out 2019.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FINOTO, E. L.; CORDEIRO JUNIOR, P. S.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; MARTINS, M. H.; SOARES, M. B. B.; MARTINS, A. L. M. Desenvolvimento e produção de soja co-inoculada com *Azospirillum brasilense* em semeadura direta sobre palhicho de cana crua. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AS CULTURAS DA SOJA E DO MILHO NO NOROESTE PAULISTA, 2., 2017, Araçatuba. **Anais...Araçatuba: Nucleus**, 2017.

HONDA, C.; SANTOS, M. B.; CEREZINI, P.; KUWANO, B. H.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Metabólitos secundários e e coinoculação com *Azospirillum* na nodulação de soja afetada por verânico. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 14., 2014, João Pessoa. **Anais...João Pessoa: Embrapa**, 2014.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (ISSN 1516-781X; n.325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (ISSN 1516-781X; n 283).

LEMAIRE, G. The physiology of grass growth under grazing: tissue turnover. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO. **Anais**. Viçosa: UFV, 1997.

- LUZ, R. A. **Bioindicadores do solo e produtividade da soja inoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em sucessão de cultivos**. 2018. 52 p. Dissertação Mestrado - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.
- MARCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995.
- MASCIARELLI, O.; URBANI L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Mecanismo alternativo para a avaliação da produção de ácido indol-3-acético (IAA) por cepas de *Azospirillum brasilense* e seus efeitos na germinação e crescimento de mudas de milho. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590-597, 2013.
- MAURÍCIO FILHO, J.; SILVA, C. H. S.; SOUZA, J. E. B. Desempenho agrônômico e produtividade da cultura da soja com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*. **Ipê Agronomic Journal**, v. 2, n. 2, p. 48 - 59, 2018.
- PAVINATO, P. S.; PAULETTI, V.; MOTTA, A. C. V.; MOREIRA, A.; MOTTA, A. C. V. Manual de adubação e calagem para o Estado do Paraná. [S.l: s.n.], 2017.
- NETO, C. S. **Inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e coinoculação com *Azospirillum brasilense* via fertilizante organomineral na cultura da soja**. 2019. 21 p. Monografia- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- NETO, F.J.D.; YOSHIMI, F.K.; GARCIA, R.D.; MIYAMOTO, Y.R.; DOMINGUES, M.C.S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resosta á aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1030, 2013.
- NOVAES, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In A. J. OLIVEIRA, W. E. GARRIDO, J. D. de ARAUJO, & S. LOURENÇO (Eds.), **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: Embrapa-SE, 1991. p. 189–253.
- PASTORE, S. M.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, W. P.; SILVA, E. A. P.; VIANA, G. S.; MENDES, M. F. S. A.; ALVES, W. J.; IGLESIAS, E. Relação treonina: lisina digestíveis na dieta de poedeiras leves de 42 a 58 semanas de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 3, 2016.
- PAVANELLI, L. E. **Fixation of nitrogen in soybean in soils under pasture and annual cultures in the west from São Paulo**. 2007. 29 p. Dissertação Mestrado- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2007.
- PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25-35, 2008.
- PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. G. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 984- 989, 1985.
- REIS JUNIOR, F. B. dos.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, I. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milhosob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 32, v. 1, p. 1139-1146, 2008.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEREDO, M. V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience journal**, v. 28, n. 1, p. 196-202, 2012.

SEDYAMA, T.; SILVA, F.; BÓREM, F. **Soja: do plantio a colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015.

SOUZA, P. J. O. P.; ORTEGA-FARIAS, S.; ROCHA, E. J. P.; SOUSA, A. M. L.; SOUZA, E. B. Consumo hídrico da soja no nordeste paraense. **Irriga**, v. Edição Esp, p. 218–231, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.

VARGAS, M.; MENDES, I.; CARVALHO, A.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUSA, D.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília: Embrapa, 2004, 416 p.

VIEIRA, F. C. F.; SANTOS JUNIOR, C. D.; NOGUEIRA, A. P. O.; DIAS, A. C. C.; 114 HAMAWAKI, O. T.; BONETTI, A. M. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por peg 6000. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 543–552, 2013.

ZANCOPE, G. J.; MORAES, M. V. P.; NASSER, J. M. **O Brasil que deu certo: A saga da soja brasileira**. Curitiba: Triade, 2005.

4. CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E FOTOSSINTÉTICA DA SOJA INOCULADA E CO-INOCULADA COM *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* SOB DÉFICIT HÍDRICO, NA FASE REPRODUTIVA

Resumo: Técnicas de cultivo que possibilitam à cultura da soja suportar condições adversas do ambiente produtivo são estudadas de forma rotineira. Essas novas técnicas visam elevar os patamares produtivos da soja, tornando as plantas mais eficientes em relação aos parâmetros fotossintéticos e produtivos, utilizando os recursos disponíveis de forma mais eficiente. As bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* se enquadram nesse contexto. Inoculadas de forma isolada ou em co-inoculação, proporcionam inúmeros benefícios ao desenvolvimento da soja. Deste modo objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação e co-inoculação das sementes da soja com as bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, nos parâmetros fisiológicos e nutricionais da cultura da soja submetida ao déficit hídrico. Foi utilizado delineamento em blocos ao acaso, com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *A. brasilense* via sementes e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições. Em R₃ e R₆ foi implantado o déficit hídrico onde posteriormente foram efetuadas análises de trocas gasosas, onde que no estágio fenológico R₃ também foi determinado o teor relativo de água (TRA), análise do teor foliar de nutrientes e o índice SPAD. A inoculação de *B. japonicum* fez com que as plantas de soja acumulassem mais N e Mg, além de apresentarem maior índice SPAD frente aos demais tratamentos. O uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* elevaram o TRA e a taxa de fotossintética da soja em R₃, sendo que as plantas que receberam essas bactérias acabaram elevando a transpiração. A inoculação com *A. brasilense* se mostrou capaz de aumentar a eficiência de assimilação do CO₂. Em R₆ a inoculação com *A. brasilense* também promoveu ganhos na fotossíntese quando comparado a testemunha. Conclui-se que a inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e co-inoculação elevam o teor relativo de água no estágio fenológico R₃ da soja em 13,58, 22,19 e 18% respectivamente. A inoculação das sementes com *B. japonicum* resultou em maior acúmulo foliar de N e Mg, com incrementos de 47,6 e 42,78% respectivamente, incrementando o teor de clorofila da soja em 6,51%. O uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em inoculação ou co-inoculação promoveu aumento nas taxas fotossintéticas da soja sob a condição de déficit hídrico.

Palavras-chave: Trocas gasosas; TRA; índice SPAD.

4. 1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das culturas de maior importância para o agronegócio e economia do Brasil, sendo uma das culturas mais produzidas mundialmente, ficando atrás apenas de milho, trigo e arroz (HIRAKURI; LAZZAROTO, 2011). Com uma produção mundial de 362 milhões de toneladas, os Estados Unidos são o maior produtor, responsável por 34,16 % da produção global da oleaginosa (USDA, 2019). O Brasil ocupa a segunda posição no ranking mundial dos países produtores, com 114,84 milhões de toneladas, o que representa 31,72% do montante da oleaginosa produzida no mundo (CONAB, 2019).

Por ser uma cultura produzida em larga escala, a cultura da soja fica exposta a inúmeras situações adversas que podem comprometer o seu desenvolvimento, resultando em redução da produtividade, sendo o déficit hídrico um dos fatores mais limitantes. A demanda hídrica da cultura da soja se encontra entre 450 a 800 mm durante todo o ciclo de desenvolvimento. A fase mais crítica à falta de água ocorre nos estádios da fase reprodutiva (SOUZA et al., 2016).

A alta demanda hídrica da soja se deve ao mecanismo fotossintético C_3 da cultura, apresentando baixa eficiência na assimilação do carbono quando comparada a uma planta C_4 , levando a soja a manter os estômatos abertos por mais tempo, o que favorece a planta perder água através da transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Situações de deficiência hídrica na fase reprodutiva, reduzem as trocas gasosas entre a planta e o ambiente nas horas mais quentes do dia, provocando redução na produtividade da soja (FARIAS et al., 2007). A redução do potencial produtivo ocorre em função do fechamento estomático que reduz a fotossíntese da planta, levando ao abortamento de estruturas reprodutivas, abscisão de folhas, redução da massa de grãos e formação de vagens vazias (VIEIRA et al., 2013).

Além dos efeitos negativos nos componentes de produção, o déficit hídrico também afeta drasticamente o processo de fixação biológica de nitrogênio, ocorrendo uma redução na emissão de pêlos radiculares, redução na síntese de leghemoglobina, abortamento de nódulos, onde o nódulo desidrata-se cessando a atividade na enzima nitrogenase (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Diante disso, algumas adaptações ao ambiente são estudadas a curto prazo, com o intuito de minimizar os efeitos do déficit hídrico na soja, uma vez que o desenvolvimento de programas de melhoramento voltados a elevar a tolerância das plantas ao déficit hídrico demandam muitos anos de pesquisa, além da dificuldade de conciliar essa característica de

tolerância nas novas cultivares sem que ocorra a redução do potencial produtivo da cultura da soja.

Dentre as técnicas que melhoram o desempenho da soja em condições de baixa disponibilidade hídrica, pode-se mencionar o uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*. A utilização de *B. japonicum* permite com que haja a quebra da tripla ligação do nitrogênio atmosférico, transformando-o em uma forma assimilável para as plantas (FAGAN et al., 2007). Essa associação entre planta e bactéria permite com que toda a demanda por nitrogênio da soja seja suprida (HUNGRIA et al., 2001) mantendo a fotossíntese, produção e translocação de fotossíntatos, crescimento de raízes e folhas (TAIZ; ZEIGER, 2013), elevando a tolerância da soja ao déficit hídrico devido as funções desempenhadas pelo nitrogênio.

No caso das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), o uso de *A. brasilense* permite com que as plantas inoculadas absorvam mais água incrementando na fotossíntese das plantas (FRANDOLOSO et al., 2012), uma vez que a água participa na fase luminosa da fotossíntese além de influenciar na atividade da enzima Rubisco (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, o suprimento adequado de água as plantas, favorece o alongamento celular pela pressão de turgor, permitindo o crescimento das plantas (CATUCHI et al., 2012).

A elevação na capacidade de absorção de água e nutrientes promovida pelo uso de *A. brasilense*, se deve a síntese de auxinas, giberelinas e citocininas mediadas pela bactéria (NETO et al., 2013), onde esses hormônios vão atuar diretamente no crescimento das plantas. Além dos efeitos relacionados ao crescimento, o uso de *A. brasilense* reduz os níveis de etileno na planta, pois atua na ação da ACC-deaminase (ARSHAD et al., 2007). Outro efeito dessa BPCV se deve a ação antagonica contra alguns patógenos, onde o *A. brasilense* é capaz de sintetizar compostos tóxicos a outros organismos (GLICK, 2014).

Outra técnica que visa aumentar a tolerância das plantas a estresses além de incrementar na produtividade da soja, é a utilização do *B. japonicum* associado ao *A. brasilense* através da co-inoculação. Essa técnica visa obter o efeito sinérgico da utilização conjunta desses microrganismos, proporcionando um sistema radicular mais desenvolvido em função do efeito hormonal promovido pelo *A. brasilense*, o que resulta em maior quantidade de sítios de infecção para o *B. japonicum*, permitindo o maior aporte de nitrogênio para a soja pela maior nodulação (FERLINI, 2006).

O déficit hídrico afeta negativamente as trocas gasosas da soja, principalmente nos estádios da fase reprodutiva, reduzindo o desenvolvimento e a produtividade da cultura.

Diante disso, a maior fixação de nitrogênio promovido pela inoculação de *B. japonicum* e a síntese de hormônios em função da inoculação com *A. brasilense*, além do maior desenvolvimento radicular e a maior fixação de nitrogênio em função da co-inoculação podem amenizar os efeitos negativos nas trocas gasosas da soja submetida ao déficit hídrico.

Portanto, o presente estudo buscou-se avaliar os tratamentos envolvendo a inoculação das sementes com *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação em diferentes estádios fenológicos da soja submetida ao déficit hídrico, buscando avaliar o comportamento da cultura frente a condição adversa, analisando o acúmulo de nutrientes nos tecidos foliares, o teor de água nas plantas e a fotossíntese da soja.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento para a avaliação das trocas gasosas e teor de nutrientes na soja inoculada e co-inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* foi implantado em 15/12/2018 na estação de cultivo protegido “Professor Mario Cesar Lopes”, em Marechal Cândido Rondon - PR. Foi adotado delineamento de blocos casualizados ao acaso com 04 tratamentos (Testemunha; Inoculação de *B. japonicum* via sementes; Inoculação com *Azospirillum brasilense* via sementes e co-inoculação de *B. japonicum* + *A. brasilense* via sementes) e 06 repetições.

Foram utilizados vasos com volume de 8 dm³. O solo utilizado com substrato foi classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013). Este apresentava as seguintes características químicas na camada de 0-20 cm: P de 13,19 mg dm⁻³, Matéria orgânica de 49,21 g dm⁻³, pH (CaCl₂) de 6,37, H+Al de 2,54 cmolc dm⁻³, Al³⁺ de 0,00 cmolc dm⁻³, K⁺ de 1,56 cmolc dm⁻³, Ca²⁺ de 8,78 cmolc dm⁻³, Mg²⁺ de 3,46 cmolc dm⁻³, CTC de 16,34 cmolc dm⁻³ e saturação por bases de 84,46%.

O solo foi fertilizado utilizando a recomendação de adubação para experimentos em vasos, fornecendo: 200 kg ha⁻¹ de N, na forma de uréia, 300 kg ha⁻¹ de K na forma de cloreto de potássio e 600 kg ha⁻¹ de P na forma de super fosfato simples, o que adicionou 8 kg ha⁻¹ de S e 17 kg ha⁻¹ de Ca (NOVAES et al., 1991).

Os dados meteorológicos de umidade relativa e temperatura, durante a condução do experimento em vasos em Marechal Cândido Rondon – PR, são apresentados na figura 4.

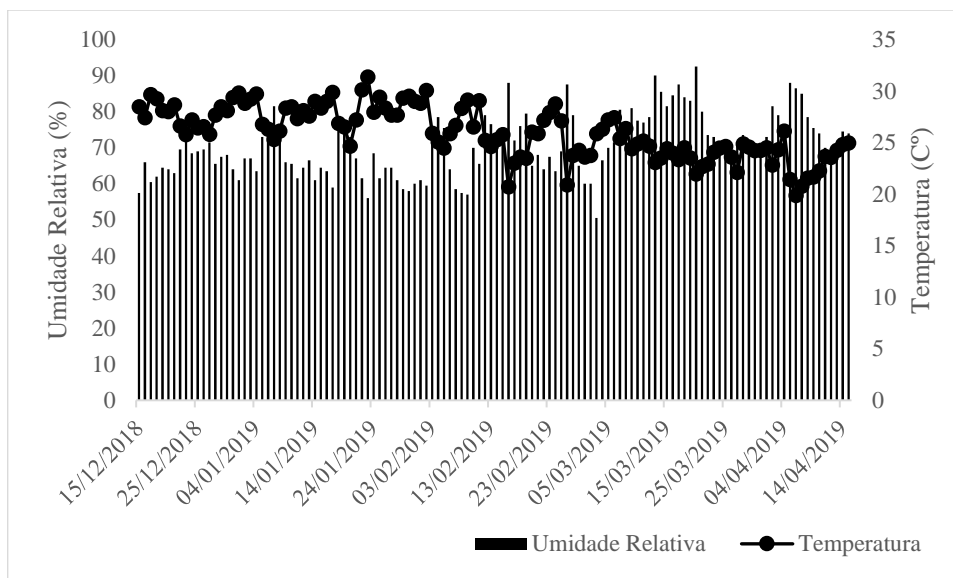


Figura 4: Condição de umidade relativa e temperatura durante a condução do experimento em vasos, barras indicam a umidade relativa e linha horizontal indica as temperaturas em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2018 – 2019.

Antes da semeadura, as sementes de soja da cultivar Monsoy 5947 Ipro foram inoculadas com as bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, através de agitação vigorosa em sacos de polietileno. As sementes também foram tratadas com inseticida (Standak top® 200 mL 100 kg⁻¹ de sementes).

A inoculação e co-inoculação das bactérias foi realizada duas horas antes da semeadura e mantidas à sombra em temperatura amena. Foram utilizados inoculantes líquidos da Empresa NITRO1000 Inoculantes Biológicos LTDA, contendo *B. japonicum*, com concentração de 2×10^9 UFC mL⁻¹ (estirpes 5079 e 5080) e *A. brasilense* (estirpes AbV5 e AbV6) com 2×10^8 UFC mL⁻¹.

As doses utilizadas foram de acordo com as recomendações da empresa para a inoculação via sementes, sendo para o inoculante contendo *B. japonicum*, 100 mL por 50 kg de sementes. Para o inoculante contendo *A. brasilense* foi utilizado 100 mL por 50 kg de sementes. Em cada vaso foram semeadas 6 sementes de soja à profundidade de 4 cm e após a emergência e desenvolvimento das folhas cotiledonares foi realizado desbaste permanecendo duas plantas em cada vaso.

Foram realizadas regas diárias com reposição de água até que os vasos atingissem a capacidade de campo, desde a germinação das sementes até o momento em que a cultura atingiu a maturação fisiológica, exceto nos momentos em que foi imposto o déficit hídrico o que corresponde ao início dos estádios fenológicos R₃ e R₆. As plantas foram

constantemente monitoradas, para garantir adequado crescimento. Para o manejo das doenças da soja foram realizadas aplicações de fungicidas contendo triazól, estrobilurina e carboxamida (400mL/ha). Para o manejo dos percevejos foram utilizados inseticidas contendo imidacloprido e cipermetrina (1000 mL/ha).

Nos estádios fenológicos R₃ e R₆ as plantas foram regadas até atingir a capacidade de campo. Em seguida iniciou-se a imposição do déficit hídrico, sendo o fornecimento hídrico interrompido nos vasos que eram destinados ao déficit hídrico. Como a fotossíntese líquida (*A*), aproximou-se de zero, as plantas foram reidratadas, após o término das avaliações e os vasos foram constantemente regados até o estágio de maturação plena da soja.

Tabela 5: Valores das condições ambientais no momento das avaliações das trocas gasosas da soja submetida ao déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon – PR, 2019.

	Temperatura	U.R. média	U.R. mínima	U.R. máxima	DPV
Estádio	(C°)	(%)	(%)	(%)	(kPa)
R ₃	27,9	67,5	45	90	1,31
R ₆	24,05	73,0	53	93	1,22

Temperatura; U.R. média: Umidade Relativa média; U.R. mínima: Umidade Relativa mínima; U.R. máxima: Umidade Relativa máxima; DPV: Diferença de Pressão de Vapor entre folha e atmosfera.

Posteriormente à imposição do déficit hídrico, foram efetuadas as análises das trocas gasosas. Para a determinação das trocas gasosas foi utilizado o equipamento IRGA (Infra Red Gas Analyser) modelo LI6400XT (Licor Inc. Lincoln, NE). As leituras foram realizadas no período compreendido entre as 08h00min e 11h00min, em dias de céu aberto, analisando uma folha por planta completamente expandida, fotossinteticamente ativas e sem lesões, localizadas no terço médio, sendo avaliadas as duas plantas de cada parcela.

Foram avaliadas a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), taxa de transpiração da folha (*E*), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (*C_i*), além das seguintes relações: $WUE = A/E$; $iWUE = A/gs$ e $Fc = A/Ci$ (ZHANG et al., 2001), correspondendo à eficiência do uso de água, eficiência intrínseca do uso de água e eficiência instantânea de carboxilação, respectivamente.

Em R₃, foi determinado o teor relativo de água (TRA) sendo realizada uma avaliação as 06h00min e outra avaliação as 12h00min, sendo calculado o valor médio entre os dois horários de amostragem. Para a avaliação do TRA foram coletados segmentos foliares de

área conhecida, utilizando o método de diferença entre massa no momento, massa turgida após 6 horas a 25°C e massa seca após 48 horas a 65°C.

Posteriormente, as folhas foram destacadas da planta e acondicionadas em sacos de papel kraft e levadas à estufa de circulação forçada de ar para secagem a 65°C, por 72h, até atingir de massa constante, onde posteriormente as amostras foram destinadas a análise do teor foliar de nutrientes.

Os dados foram submetidos a análise de variância, e quando apresentaram 95% de nível de confiança, as médias foram comparados por teste de Tukey a 95% de nível de confiança com auxílio do software estatístico SISVAR versão 5.1, build 72 (FERREIRA, 2011).

4.3 RESULTADOS

Considerando os resultados para o teor relativo de água (TRA), nos momentos em que a cultura da soja se encontrava nos estádios fenológicos R₃ e R₆, verificou-se que a utilização das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* inoculadas de forma isolada ou em co-inoculação interferiram significativamente na variável no estágio fenológico R₃. Todos os tratamentos com inoculação apresentaram médias semelhantes entre si, além de apresentarem maior TRA que o tratamento testemunha com incrementos de 13,58, 22,19, e 18% para inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e co-inoculação respectivamente. Quando a cultura da soja se encontrava no estágio fenológico R₆, não foi encontrada diferença significativa para as médias do TRA entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6: Valores médios para teor relativo de água (TRA) em soja inoculada e co-inoculadas com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha nos estádios fenológicos R₃ e R₆, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

	TRA (R ₃)	TRA (R ₆)
Tratamento	(%)	(%)
Testemunha	64,21b	69,25 ^{ns}
<i>B. japonicum</i>	72,93a	72,20
<i>A. brasilense</i>	78,46a	66,23
Co-inoculação	75,81a	72,92
C.V (%)	6,90	7,62
DMS	8,58	8,89

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Para o teor foliar de nutrientes no estágio fenológico R₃ da soja, não foi verificada diferença entre os tratamentos envolvendo a inoculação e co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* e a testemunha para Ca, P e K. Entretanto, para Mg e N, a inoculação e a co-inoculação com as bactérias influenciaram significativamente como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7: Valores médios para o teor foliar de nutrientes e índice SPAD soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estágio fenológico R₃, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

	N	P	K	Ca	Mg	SPAD
Tratamentos	(g/kg)					
Testemunha	49,09b	4,80 ^{ns}	20,00 ^{ns}	14,28 ^{ns}	2,32b	43,45b
<i>B. japonicum</i>	72,46a	5,96	19,45	14,13	4,06a	46,28a
<i>A. brasilense</i>	53,53b	5,74	19,88	13,91	3,57ab	44,67ab
Co-inoculação	53,74b	5,91	19,22	14,34	3,65ab	44,15ab
C.V (%)	11,31	24,20	3,08	6,74	22,36	3,22
DMS	12,15	2,55	1,14	1,79	1,42	2,36

Médias para teor foliar de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e índice SPAD seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

No caso do Mg, a inoculação com *B. japonicum* elevou em 42,78% o teor foliar do nutriente em comparação a testemunha, no entanto, essa forma de inoculação não apresentou diferença em comparação aos demais tratamentos envolvendo inoculação e co-inoculação. Para a inoculação isolada de *A. brasilense* e a co-inoculação, percebe-se que esses tratamentos não apresentaram diferença no teor de Mg foliar em comparação a testemunha.

Em relação ao teor foliar de N, a inoculação com *B. japonicum* proporcionou incremento de 47,6% no teor do elemento, onde esse tratamento se mostrou superior a inoculação apenas com *A. brasilense*, co-inoculação e a testemunha.

Ainda na tabela 7 verifica-se que o índice SPAD apresentou resultados semelhantes ao teor de N foliar. O tratamento com *B. japonicum* apresentou as maiores médias para a variável, demonstrando a relação entre o teor de N e o teor de clorofila uma vez que o elemento é constituinte da molécula de clorofila (TAIZ, ZEIGER, 2013).

Para as trocas gasosas no estágio fenológico R₃ da cultura da soja, percebe-se que os tratamentos com inoculação e co-inoculação envolvendo o uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* influenciou significativamente as taxas de trocas gasosas foliares. Houveram

efeitos significativos para assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (*Ci*), transpiração (*E*), eficiência no uso da água (*WUE*), eficiência intrínseca no uso da água (*iWUE*) e eficiência instantânea de carboxilação (*fc*) (Tabela 8).

Tabela 8: Valores médios para as trocas gasosas na soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estádio fenológicos R₃, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

Tratamentos	<i>A</i> μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	<i>gs</i> mol m ⁻² s ⁻¹	<i>Ci</i> μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>E</i> mmol m ⁻² s ⁻¹	<i>WUE</i> μmolCO ₂ /mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	<i>iWUE</i> μmol CO ₂ / mol m ⁻² s ⁻¹	<i>Fc</i> μmol m ⁻² s ⁻¹ CO ₂ ⁻¹
Testemunha	19,36b	0,33b	285,83a	2,69b	7,24a	58,49b	0,07b
<i>B.japonicum</i>	24,80a	0,45a	279,63a	3,62a	6,85ab	55,16b	0,09ab
<i>A.brasilense</i>	24,37a	0,29b	225,14b	4,01a	6,12ab	86,74a	0,11a
Co-inocul.	24,78a	0,27b	222,40b	4,09a	5,82b	87,69a	0,11a
C.V (%)	10	13,40	9,16	12,08	11,43	18,32	21,96
DMS	3,88	0,02	38,60	0,72	1,24	21,97	0,03

Médias de Assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (*Ci*), transpiração (*E*), eficiência no uso da água (*WUE*), eficiência intrínseca no uso da água (*iWUE*) e eficiência instantânea de carboxilação (*Fc*) seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

No caso da *A*, não houve diferença entre os tratamentos envolvendo inoculação e co-inoculação. No entanto, todos foram superiores à testemunha onde a inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e co-inoculação apresentaram médias de 24,80, 24,37 e 24,78 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, respectivamente, enquanto a testemunha apresentou 19,36 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹. A Inoculação e co-inoculação de sementes incrementaram a fotossíntese em 21,92, 20,54 e 21,86%, respectivamente.

Em relação à *gs*, a inoculação com *B. japonicum* promoveu maior abertura estomática das plantas de soja, com média de 0,45 mol m⁻² s⁻¹, frente a 0,29 mol m⁻² s⁻¹ para *A. brasilense*, 0,27 mol m⁻² s⁻¹ para a co-inoculação e 0,33 mol m⁻² s⁻¹ referente à testemunha, o que representa incrementos na ordem de 35,54, 39,56 e 27,12%, respectivamente.

Para a *Ci*, plantas inoculadas com *A. brasilense* e a co-inoculação foram semelhantes e resultaram nas menores médias para a variável, sendo que a inoculação com *A. brasilense* resultou em um acúmulo de CO₂ na câmara subestomática de 225,16 μmol m⁻² s⁻¹ enquanto que a co-inoculação apresentou 222,40 μmol m⁻² s⁻¹. Entretanto as maiores médias para *Ci*

foram encontradas para a testemunha e a inoculação isolada com *B. japonicum* as quais foram semelhantes entre si com médias de 285,83 e 279,63 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o que representa um incremento de aproximadamente 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na concentração de CO_2 .

Em relação a *E*, todos os tratamentos envolvendo o uso dos inoculantes contendo as estirpes de *B. japonicum* e *A. brasilense* e a associação de ambas bactérias em co-inoculação apresentaram médias semelhantes entre si para a variável analisada, e transpiraram mais do que a testemunha. As médias para a inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação foram 3,62, 4,00 e 4,09 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente, enquanto a testemunha apresentou 2,69 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de água transpirada.

A maior quantidade de água perdida para a atmosfera na forma de vapor de água por meio da *E*, pode ser observada nos tratamentos envolvendo o uso da inoculação isolada com *B. japonicum* e *A. brasilense* e a co-inoculação com essas bactérias onde a superioridade verificada em relação a testemunha foi de 0,93, 1,32 e 1,40 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, o que representa 25,76; 32,86 e 34,26% a mais de água perdida para a atmosfera.

Para a *WUE*, a testemunha apresentou 7,25 $\mu\text{molCO}_2/\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sendo superior a co-inoculação que apresentou 5,82 $\mu\text{molCO}_2/\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que representa 19,73% a mais de eficiência para a testemunha em relação a co-inoculação. Para a inoculação isolada com *B. japonicum* e *A. brasilense* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos além de não apresentaram diferença significativa em relação a testemunha e a co-inoculação.

Considerando a *iWUE*, verifica-se que os tratamentos com a inoculação isolada com *A. brasilense* e a co-inoculação apresentaram médias de 86,74 e 87,69 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente sendo semelhantes entre si, no entanto, apresentaram superioridade significativa em comparação a testemunha e a inoculação com *B. japonicum* que apresentaram médias de 58,50 e 55,16 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente.

No caso da *Fc*, plantas de soja inoculadas com *A. brasilense* e co-inoculadas foram semelhantes e demonstraram incrementos significativos de 0,045 e 0,041 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{CO}_2^{-1}$ em relação a testemunha, demonstrando que esses tratamentos elevam a fixação do carbono, enquanto que a inoculação apenas com *B. japonicum* se assemelhou a inoculação com *A. brasilense* e a co-inoculação além de não diferir significativamente da testemunha.

Para as trocas gasosas no estágio fenológico R6 os tratamentos com a utilização das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* e a co-inoculação de ambas bactérias influenciaram nas variáveis *A*, *E* e na *Fc*, enquanto que as variáveis *gs*, *Ci*, *WUE* e *iWUE* não foram significativos, como observado na tabela 9.

Tabela 9: Valores médios para as trocas gasosas na soja inoculada e co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* no tratamento de sementes e testemunha no estádio fenológicos R₆, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

	<i>A</i>	<i>gs</i>	<i>Ci</i>	<i>E</i>	<i>WUE</i>	<i>iWUE</i>	<i>Fc</i>
Tratamentos	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2 / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2^{-1}$
Testemunha	20,61b	0,31 ^{ns}	259,70 ^{ns}	3,41c	6,30 ^{ns}	70,83 ^{ns}	0,06b
<i>B. japonicum</i>	24,27ab	0,36	257,91	4,13a	5,94	69,18	0,09ab
<i>A. brasilense</i>	25,54a	0,35	251,06	4,09ab	6,30	74,52	0,10a
Coinoculação	23,05ab	0,34	254,32	3,43bc	6,82	71,25	0,09ab
C.V (%)	11,02	11,32	13,75	10,71	11,86	18,44	24,75
DMS	4,28	0,06	81,45	0,67	1,25	21,92	0,03

Médias de Assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (*Ci*), transpiração (*E*), eficiência no uso da água (*WUE*), eficiência intrínseca no uso da água (*iWUE*) e eficiência instantânea de carboxilação (*Fc*) seguidas das mesmas letras minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Em relação a *A*, não houve diferença significativa entre os tratamentos com inoculação e co-inoculação, no entanto a inoculação apenas com *A. brasilense* resultou em plantas com maior assimilação de CO₂ em relação a testemunha com incremento de 4,94 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o que corresponde a um aumento de 19,31% na *A*. Para a inoculação apenas com *B. japonicum* e a co-inoculação, percebe-se que os tratamentos foram semelhantes entre si e não apresentaram diferença significativa para *A* em comparação a testemunha e a inoculação apenas com *A. brasilense*.

Quanto a *E*, a inoculação com *B. japonicum* fez com que as plantas de soja perdessem mais água. A co-inoculação e a testemunha transpiraram 0,70 e 0,72 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a menos que a inoculação apenas com *B. japonicum*, o que representa uma redução na transpiração de 16,91 e 17,48%, respectivamente. No caso da inoculação com *A. brasilense*, foi observada média semelhante para *E* quando comparada a inoculação com *B. japonicum* e a co-inoculação, entretanto foi superior a testemunha, transpirando 0,68 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a mais do que a testemunha, o que corresponde a um aumento de 16,63% na *E*.

Em relação a *Fc*, plantas de soja inoculadas com *A. brasilense* mostraram se mais eficientes na fixação do CO₂, apresentando 0,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2^{-1}$ a mais do que a testemunha, fixando 40% a mais de CO₂. No caso da inoculação com *B. japonicum* e a co-inoculação os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, além de não

diferir significativamente quando comparados a testemunha e a inoculação com *A. brasilense*.

4.4 DISCUSSÕES

Apesar de o TRA não ser significativo em R₆, alguns parâmetros fotossintéticos acabaram sendo influenciados pelos tratamentos. Portanto, quando o TRA é analisado de forma isolada acaba não representando de forma eficaz os tratamentos envolvendo a inoculação de *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação.

Em condições de vasos os parâmetros associados à fotossíntese, principalmente a A em alguns casos acaba não apresentando as mesmas respostas que o TRA, sendo que isso ocorre ao fato de que independentemente do tratamento aplicado, a soja cultivada em vasos acaba consumindo de forma semelhante a água disponível no substrato, em condições de déficit hídrico (BULEGON, 2019).

Quando se analisa o TRA em R₃, é possível observar que o uso dos tratamentos acaba elevando o TRA das plantas de soja em relação à testemunha, o que ajuda a explicar em parte os resultados obtidos para as variáveis relacionadas à fotossíntese. Plantas de soja que apresentam maior TRA mostram-se fotossinteticamente superiores. Isso se deve à importância da água no processo fotossintético, pois os primeiros elétrons para o transporte eletrônico e o início da fotossíntese das plantas, origina-se com hidrólise da água, além do papel crucial da água na eliminação de radicais livres, conferindo proteção ao aparato fotossintético (SLAMA et al., 2015) e auxiliando na regulação térmica da planta (ROSA et al., 2005).

A utilização da bactéria *A. brasilense* de forma isolada e em co-inoculação permite com que as plantas sejam supridas de água, o que está relacionado a algumas respostas fisiológicas que levam as plantas de soja ao melhor aproveitamento da água disponível, reduzindo as perdas de água durante o processo de assimilação de CO₂ (SWARTHOUT et al., 2009). O *A. brasilense* exerce influência sobre a regulação estomática (KUSS et al., 2007) podendo estar associado à sinalização via ácido abscísico, que leva a planta a fechar estômatos (CASSÁN, PERRIG, et al., 2009), mantendo as plantas com maior TRA em relação a testemunha.

O aumento do TRA em função da inoculação com *A. brasilense*, também pode ser explicado pelo fato da bactéria promover redução no tamanho dos estômatos além de incrementar a espessura da epiderme foliar (LARRABURU; LLORENTE, 2015). Essas

alterações anatômicas resultam em menor perda de água (TAIZ; ZEIGER, 2013). Diante disso, a inoculação de *A. brasilense* mostra-se como uma ferramenta para elevar a tolerância das plantas a deficiência hídrica (BULEGON, 2016).

Quanto ao maior TRA observado para inoculação com *B. japonicum*, maior crescimento das plantas em função do maior aporte de N para as plantas inoculadas, o que pode ser constatado pela análise do teor de nutrientes nas folhas. O N tem papel de grande importância para o crescimento da soja, pois participa da constituição de aminoácidos, proteínas e lipídeos (HUNGRIA et al., 2011). O suprimento adequado desse nutriente via FBN auxilia na manutenção do teor de água nas plantas, uma vez que o N atua no metabolismo. Isso se deve ao fato de o elemento ser constituinte da clorofila e aminoácidos elevando a fotossíntese da planta, além de manter as plantas com maior conteúdo de água nos tecidos aumentando o TRA (TAIZ, ZEIGER, 2013).

Para o teor de nutrientes foliares, os maiores teores de Mg e N obtidos no tratamento envolvendo o uso de *B. japonicum* podem ajudar a explicar os maiores valores médios obtidos para o índice SPAD, uma vez que esses elementos constituem a molécula de clorofila, além de ser constituinte de enzimas e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2013). A maior quantidade de N acumulada nas folhas de soja em função da utilização de *B. japonicum* se deve ao processo da fixação biológica do elemento, resultando em maior aporte e acúmulo de N na parte aérea da soja (FAGAN et al., 2007).

Quanto as variáveis relacionadas à fotossíntese, constata-se que em R₃ ocorreu aumento significativo na *A* em função da inoculação das sementes com as bactérias *B. japonicum*, *A. brasilense* e a co-inoculação. Esses ganhos podem ser associados à maior *E* em plantas submetidas aos tratamentos, o que indica que as bactérias elevam o suprimento de água para as plantas de soja inoculadas, sendo explicado pelo maior TRA, elevando a quantidade de água perdida para a atmosfera, mas em contrapartida permitindo maior assimilação de CO₂.

Os maiores valores para *A* e menores *C_i* em função dos tratamentos com *A. brasilense* e co-inoculação remete que plantas submetidas a esses tratamentos conseguem atingir maiores taxas fotossintéticas, demonstrando que o uso de *A. brasilense* aumenta a eficiência de assimilação de CO₂ (*F_c*). Resultado semelhante foi obtido em R₆ sendo que apesar da variável *C_i* não ser significativa a *A* e a *F_c* apresentaram comportamentos semelhantes, demonstrando o aumento na *F_c* promovido pelo uso do *A. brasilense* em relação a testemunha.

Quanto a F_c , observa-se que os tratamentos que receberam a inoculação de *A. brasilense* de forma isolada ou em co-inoculação apresentaram maior eficiência na fixação do CO_2 em relação a testemunha sendo que F_c apresentou aumento com o uso das bactérias enquanto que a C_i decresceu. Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Bulegon et al. (2016) onde que a F_c apresentou correlação com a C_i demonstrando a capacidade da bactéria estimular a fixação de CO_2 na soja. Esse incremento na F_c em função da inoculação de *A. brasilense* está atrelado a maior atividade da enzima Rubisco, onde as plantas inoculadas acabam aproveitando melhor o substrato disponível, elevando a A (FLEXAS et al., 2006).

Em relação a g_s , nota-se que os tratamentos que receberam *A. brasilense*, tiveram médias semelhantes a testemunha, mantendo os estômatos mais fechados do que o tratamento que recebeu a inoculação de *B. japonicum*. Esse efeito promovido pelo *A. brasilense* pode ser uma ferramenta de defesa da planta frente a condições de estresse, considerando que o fechamento estomático é a primeira forma das plantas tolerarem o déficit hídrico e as altas temperaturas, com o intuito de reduzir as perdas de água pela transpiração (HUESO, GARCÍA E HERNÁNDEZ, 2012).

O uso de *A. brasilense* promove o efeito biorregulador nas plantas (PEDRAZA, 2008) o qual está relacionado a síntese de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (NETO et al., 2013). Dessa forma acredita-se que o uso de *A. brasilense* exerce influência sobre a regulação estomática (KUSS et al., 2007), uma vez que abertura e fechamento estomático sofre a influência de inúmeros fatores dentre eles o efeito hormonal (TAIZ; ZEIGER, 2013), onde a utilização *A. brasilense* auxilia a planta de soja a manter maior teor de água em seus tecidos mesmo em situações de déficit hídrico.

No caso da C_i , de acordo com Bulegon (2016), a maior C_i pode ser considerada benéfica ou indesejada o que vai depender da A , onde valores adequados de A e alta C_i demonstra que o aparato fotossintético está ativo, enquanto que baixos valores de A e altos valores de C_i remetem a uma deficiência no aparato fotossintético.

Apesar da redução na C_i , a taxa fotossintética se manteve alta, sendo que o uso de *A. brasilense* promoveu a maior fixação de CO_2 , enquanto que para a testemunha além da menor C_i apresentou menor A em relação aos demais tratamentos o que se deve a uma falha no aparato fotossintético, onde essa falha está atrelada a falta de água promovida pelo déficit hídrico. A falta de água afeta drasticamente a atividade da Rubisco, onde o CO_2 não é carboxilado e incorporado no ciclo de Calvin, dessa forma reduz a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em relação a inoculação apenas com *B. japonicum* elevou a *A*, *E* e *gs* em comparação a testemunha o que se deve ao maior acúmulo de nitrogênio, como pode ser observado na análise foliar de nutrientes. A inoculação de *B. japonicum* nas sementes de soja permite o suprimento de nitrogênio através da FBN, onde o elemento participa de inúmeras enzimas e proteínas, sendo indispensável para o metabolismo e crescimento das plantas além de participar da constituição da molécula de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013),

Dessa forma a inoculação com *B. japonicum* favorece o crescimento da soja mesmo em situações de déficit hídrico, permitindo maior absorção de água do solo. Plantas supridas com água mantem seus estômatos abertos por mais tempo, permitindo as trocas gasosas entre a planta e o ambiente, onde nesse processo inevitavelmente vai ocorrer a perda de água na forma de vapor (PIMENTEL, 2004). Por outro lado, a maior *gs* e *E* acabam permitindo a maior difusão de CO₂ para o interior dos estômatos, elevando a atividade fotossintética da soja (BULEGON et al., 2016).

Assim, plantas que apresentam maior *gs* apresentam a enzima Rubisco mais ativa, devido a não haver limitação do substrato, apresentando maiores taxas fotossintéticas (FLEXAS et al., 2006), onde a *gs* é o mecanismo fisiológico das plantas que controla a *E* (JADOSKI et al., 2005), sendo a *E* responsável pelas trocas gasosas entre a planta e o ambiente. Além disso, a *E* irá auxiliar no resfriamento foliar em situações de altas temperaturas, garantindo que a atividade do aparato fotossintético não seja comprometida pela redução da atividade de enzimas, como a Rubisco (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No caso da *iWUE*, os tratamentos envolvendo a inoculação com *A. brasilense* e a co-inoculação resultaram em plantas com *A* superior a testemunha e semelhante ao *B. japonicum* mesmo com *gs* semelhante a testemunha e menor que o *B. japonicum*, o que demonstra que a presença de *A. brasilense* proporciona respostas fisiológicas nas plantas, levando a um melhor aproveitamento da água (INAGAKI et al., 2015).

No caso da *WUE*, percebe-se que a testemunha se mostrou mais eficiente que a co-inoculação, entretanto com menor *A*. A superioridade apresentada pela testemunha nessa variável está relacionada ao fato de a testemunha ter apresentado menor *E* que os demais tratamentos e com mais CO₂ na câmara subestomática em comparação aos tratamentos com *A. brasilense* e a co-inoculação permitindo uma assimilação de CO₂ com menor quantidade de água perdida, o que elevou a *WUE* da testemunha.

A *WUE* é um parâmetro importante para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, onde o fato da testemunha apresentar boa *WUE* se deve a cultivar de soja utilizada apresentar boa tolerância ao déficit hídrico, onde que a planta acaba utilizando de forma mais

eficiente a água armazenada em seus tecidos com menor E , devido a uma rápida adaptação fisiológica provocada pelo estresse do ambiente (HOSSAIN et al., 2014).

Em R_6 é possível observar que a inoculação apenas com *A. brasilense* apresentou maior A que a testemunha, no entanto, a g_s não apresentou diferença entre os tratamentos, onde alguns trabalhos demonstram que mesmo que haja redução da g_s a A não é limitada tão drasticamente quanto a E (CHAVES; OLIVEIRA, 2004), pois mesmo com os estômatos parcialmente abertos o CO_2 difunde-se para a câmara subestomática, permitindo com que a A não seja afetada de forma tão drástica, (TAIZ; ZEIGER, 2013)

A inoculação com *A. brasilense* apresentou maior F_c demonstrando a capacidade dessa bactéria em elevar a atividade da Rubisco, aumentando a A (FLEXAS et al., 2006), onde o uso da bactéria acabou elevando as taxas fotossintéticas da soja em comparação a testemunha. Dessa forma, a inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* originaram plantas com maior eficiência fotossintética pelo fato de apresentarem incrementos nas taxas de trocas gasosas (FRANDOLOSO et al., 2012).

Já a utilização de *B. japonicum* permitiu o suprimento de nitrogênio através da fixação biológica, mantendo as plantas com médias semelhantes a inoculação apenas com *A. brasilense*, sendo que isso se deve ao fato do elemento participar de inúmeras enzimas e proteínas, sendo indispensável para o metabolismo e crescimento das plantas, participando da constituição da molécula de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013), o que ajuda a manter a capacidade fotossintética das plantas de soja inoculadas com essa bactéria.

4.5 CONCLUSÕES

A inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e co-inoculação elevam o teor relativo de água no estágio fenológico R_3 da soja em 13,58, 22,19 e 18% respectivamente.

A inoculação das sementes com *B. japonicum* resulta em maior acúmulo foliar de N e Mg, com incrementos de 47,6 e 42,78% respectivamente, incrementando o teor de clorofila da soja em 6,51%.

O uso das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em inoculação ou co-inoculação promove aumento nas taxas fotossintéticas da soja sob a condição de déficit hídrico.

4.6 REFERÊNCIAS

- ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 356–362, 2007.
- BULEGON, L.G. **Azospirillum brasilense e reguladores vegetais na mitigação dos efeitos da intoxicação por mesotriona no milho e do déficit hídrico na soja**. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2019. 193p. Tese Doutorado.
- BULEGON, L.G.; GUIMARÃES, V.F.; EGEWARTH, V.A.; SANTOS, M.G.; HELING, A.L.; FERREIRA, S.D.; WENGRAT, A.P.G.S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, Sinop, v.4, n.5, p. 277-286, 2016.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.
- CATUCHI, T. A.; VIEIRA, F.; GUIDORIZZI, C.; GUIDORIZI, K. A. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 519–527, 2012.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento Agrícola – (2019) **Quarto levantamento de grãos**. Safra 2018/19. Disponível em: Acesso em: 10/01/2019.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília/ Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.
- FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D. D.; LIER, Q. D. J. Van; SANTOS, O. S. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - revisão. **Revista FZVA**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.
- FERLINI, H.A. **Co-inoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Santa Fé, Engormix, 2006. 6p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, SISVAR, 2011, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- FRANDOLOSO, J. et al. Efeito de Doses de Inoculante Líquido no Desempenho das Trocas Gasosas de dois Genótipos de Milho. **XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO**. Anais...Águas de Lindóia: 2012.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- HIRAKURI, M., H.; LAZZAROTTO, J. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja**. Embrapa soja; Londrina, 2011.
- HOSSAIN, M. M.; LIU, X.; QI, X.; LAM, H.M.; ZHANG, J. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **The Crop Journal**, v. 15, n. 5, p. 1-15, 2014.
- HUESO, S.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 167–173, 2012.

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES I.D.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2001.
- INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; LANA, C.; KLEIN, J.; RODRIGUES, A. C. P.; ROFRIGUES, L. O. S.; RAMPIM, L. Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 4, p. 271–280, 2015.
- JADOSKI, S. O.; KLAR, A. E.; SALVADOR, E. D. Relações hídricas e fisiológicas em plantas de pimentão ao longo de um dia. **Ambiência**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2005.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.
- LARRABURU, E. E.; LLORENTE, B. E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 175–184, 2015.
- NETO, F.J.D.; YOSHIMI, F.K.; GARCIA, R.D.; MIYAMOTO, Y.R.; DOMINGUES, M.C.S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resosta á aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia biosfera**, v.9, n.17, p.1030, 2013.
- NOVAES, R. F. DE; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. DE. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Eds.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília DF: Embrapa-SE, 1991. p. 189–253.
- NOVAES, R. F. DE; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. DE. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Eds.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília DF: Embrapa-SE, 1991. p. 189–253.
- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125 n.1 p. 25-35, 2008.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropedica: Edur, 2004.
- ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, É. V. R.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.
- SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, n. 1, p. 69–76, 2015.
- SOUZA, P. J. O. P.; ORTEGA-FARIAS, S.; ROCHA, E. J. P.; SOUSA, A. M. L.; SOUZA, E. B. Consumo hídrico da soja no nordeste paraense. **Irriga**, v. Edição Esp, p. 218–231, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.
- USDA. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington D. C.: United States Departmente of Agriculture, 2019.
- VIEIRA, F.C.F.; SANTOS JUNIOR, C.D.; NOGUEIRA, A. P. O.; DIAS, A.C.; HAMAWAKI, O.T.; BONETTI, A.M. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de

soja submetidos a déficit hídrico induzido por peg 6000. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 543-552, 2013.

ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature-Dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383-388, 2001.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A cultura da soja fica exposta a inúmeras situações adversas no ambiente produtivo, como é o caso do déficit hídrico. As bactérias fixadoras de nitrogênio e as promotoras de crescimento vegetal se mostram capazes de proporcionar inúmeros benefícios a cultura da soja frente inúmeras situações.

A prática da inoculação e da co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*, no tratamento de sementes, proporciona inúmeros benefícios para a cultura da soja, influenciando positivamente alguns parâmetros relacionados a biometria das plantas como o diâmetro de coleto, número de nódulos por planta, massa seca de raiz e a massa seca total.

Além disso, a produtividade a campo também é incrementada quando se faz o uso dessas bactérias, principalmente em condições em que a cultura é exposta ao déficit hídrico. Quando a soja é exposta ao déficit hídrico, plantas que recebem essas bactérias, demonstram maior capacidade fotossintética, utilizando o CO₂ disponível de forma mais eficiente e controlando as trocas gasosas com o meio de forma mais eficiente, mantendo a planta hidratada mesmo nas fases de maior demanda de água pela cultura.

Entretanto, para obtenção de resultados satisfatórios, inúmeros cuidados relacionados ao manejo desses microrganismos devem ser adotados, com o intuito de explorar da melhor forma os benefícios promovidos pelo *B. japonicum* e o *A. brasilense*. Portanto, a realização de novos estudos envolvendo essas bactérias é essencial, visando aprimorar o processo de inoculação e co-inoculação, para cada situação que a cultura é exposta, obtendo-se assim, altos patamares de produtividade com redução dos custos de produção e de forma mais sustentável.