

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FERNANDA CARVALHO BARROS

*Azospirillum brasilense* VIA FERTILIZANTE ORGANOMINERAL COINOCULADO  
COM *Bradyrhizobium japonicum* NA CULTURA DA SOJA

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

FERNANDA CARVALHO BARROS

*Azospirillum brasilense* VIA FERTILIZANTE ORGANOMINERAL COINOCULADO  
COM *Bradyrhizobium japonicum* NA CULTURA DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo de Camargo

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B277a Barros, Fernanda Carvalho, 1982  
2019 *Azospirillum brasilense* via fertilizante organomineral coinoculado com *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja [recurso eletrônico] / Fernanda Carvalho Barros. - 2019.

Orientador: Reginaldo de Camargo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1247>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Agronomia. 2. Soja. 3. Fertilizantes nitrogenados. 4. Nitrogênio - Fixação. I. Camargo, Reginaldo de, 1972, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

---

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FERNANDA CARVALHO BARROS

*Azospirillum brasilense* VIA FERTILIZANTE ORGANOMINERAL  
COINOCULADO COM *Bradyrhizobium japonicum* NA CULTURA DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,  
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em  
Agronomia – Doutorado, área de concentração em  
Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Regina Maria Quintão Lana UFU

Profa. Dra. Flávia Nery UFU

Prof. Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque UFMG

Prof. Dr. Emmerison Rodrigues de Moraes IFGO

  
Prof. Dr. Reginaldo de Camargo  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Reginaldo de Camargo pela valiosa oportunidade de realizar este trabalho e pela orientação atenciosa ao longo da jornada.

A todos os técnicos e funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), em especial aos do Laboratório de Análise de Solos e Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Uberlândia, por todo auxílio e atenção.

Aos amigos e colegas pelo tempo de convívio e estudos em grupo, em especial ao Vanderley José Pereira por toda atenção e paciência.

Aos alunos de graduação: Ana Luísa, Carlos e Ricardo pelo auxílio nas avaliações dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento de bolsa de estudos, às empresas Stoller e Geociclo pelo fornecimento dos inoculantes e fertilizante organomineral.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho de doutorado.

A toda minha família pelo apoio, em especial ao meu querido esposo Luciano da Rocha Magalhães, que tanto auxiliou em todas as etapas deste trabalho.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS.....   | i    |
| LISTA DE FIGURAS.....   | v    |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....   | viii |
| RESUMO GERAL.....   | x    |
| GENERAL ABSTRACT.....   | xi   |
| CAPÍTULO 1 .....  | 1    |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL.....   | 2    |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....  | 3    |
| 2.1 Inoculação.....   | 3    |
| 2.2 Coinoculação.....   | 5    |
| 2.3 Estado Nutricional.....   | 7    |
| 2.4 Estresse oxidativo em plantas.....  | 7    |
| 2.6 Fertilizante organomineral.....   | 7    |
| 2.5 Lodo de Esgoto.....   | 9    |
| REFERÊNCIAS.....  | 11   |
| CAPÍTULO 2 - Coinoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i><br>em teste de germinação e crescimento de plântulas de soja .....                | 18   |
| RESUMO.....   | 19   |
| ABSTRACT.....   | 20   |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 21   |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 22   |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 24   |
| 4 CONCLUSÃO.....  | 27   |
| REFERÊNCIAS.....  | 27   |
| CAPÍTULO 3 - Doses de <i>Azospirillum brasilense</i> via fertilizante organomineral<br>coinoculado com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na cultura da soja até o florescimento.. | 31   |
| RESUMO.....   | 32   |
| ABSTRACT.....   | 33   |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 34   |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 35   |
| 2.1 Condução.....   | 3    |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.2     | Avaliações.....  | 38 |
| 2.2.1   | Análises Fenométricas.....   | 38 |
| 2.2.2   | Teor de Clorofila.....   | 38 |
| 2.2.3   | Análise Química.....   | 39 |
| 2.3     | Análise Estatística.....   | 39 |
| 3       | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 40 |
| 3.1     | Altura de Plantas.....   | 40 |
| 3.2     | Massa Seca de Parte Aérea (MSPA).....  | 41 |
| 3.3     | Área foliar (AF).....  | 42 |
| 3.5     | Teor de Clorofila.....   | 43 |
| 3.6     | Análise Química.....   | 44 |
| 4       | CONCLUSÃO.....   | 48 |
|         | REFERÊNCIAS.....   | 48 |
|         | CAPÍTULO 4 - Doses de <i>Azospirillum brasilense</i> via fertilizante organomineral<br>coinoculado com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na cultura da soja..... | 53 |
|         | RESUMO.....  | 54 |
|         | ABSTRACT.....  | 55 |
| 1       | INTRODUÇÃO.....  | 56 |
| 2       | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 57 |
| 2.1     | Condução.....  | 59 |
| 2.2     | Avaliações.....  | 60 |
| 2.2.1   | Análises Fenométricas.....   | 60 |
| 2.2.2   | Teor de Clorofila.....   | 60 |
| 2.2.3   | Análises Bioquímicas.....  | 61 |
| 2.2.3.1 | Teor de proteína total solúvel em folhas.....  | 62 |
| 2.2.3.2 | Peroxidase (POD).....  | 62 |
| 2.2.3.3 | Superóxido dismutase (SOD).....  | 62 |
| 2.2.3.4 | Catalase (CAT).....  | 63 |
| 2.2.3.5 | Peroxidação lipídica (PL).....   | 63 |
| 2.2.3.6 | Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....   | 64 |
| 2.2.3.7 | Prolina.....   | 64 |
| 2.2.4   | Análise química.....   | 65 |
| 2.2.5   | Indicadores de Produtividade.....  | 65 |
| 2.3     | Análise estatística.....   | 65 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2    | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                  | 66 |
| 3.1  | Altura de Plantas.....                                       | 66 |
| 3.2  | Diâmetro de colo.....  | 67 |
| 3.3  | Massa Seca de Parte Aérea (MSPA).....                        | 69 |
| 3.4  | Área foliar (AF).....  | 70 |
| 3.5  | Teor de Clorofila.....                                       | 71 |
| 3.6  | Proteína Total Solúvel (PTS).....                            | 75 |
| 3.7  | Superóxido dismutase (SOD).....                              | 77 |
| 3.8  | Catalase (CAT).....  | 80 |
| 3.9  | Peroxidase (POD).....  | 82 |
| 3.10 | Peroxidação Lipídica (PL).....                               | 84 |
| 3.11 | Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )..... | 86 |
| 3.12 | Prolina (PROL).....  | 89 |
| 3.13 | Análise Química.....   | 92 |
| 3.14 | Indicadores de Produtividade.....                            | 94 |
| 4    | CONCLUSÃO .....  | 98 |
|      | REFERÊNCIAS.....   | 98 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>TABELA 1</b> | Teste de germinação de sementes em função de inoculação e coinoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 25 |
| <b>TABELA 2</b> | Médias de crescimento de plântulas em função de inoculação e coinoculação, de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 26 |
| <b>TABELA 3</b> | Descrição dos tratamentos utilizados no experimento. UFU. Uberlândia, 2019.....   | 36 |
| <b>TABELA 4</b> | Caracterização química da amostra do solo coletado. UFU. Uberlândia, 2019.....  | 37 |
| <b>TABELA 5</b> | Altura média de plantas de soja (estádios V6 e R2) submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 40 |
| <b>TABELA 6</b> | Massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 41 |
| <b>TABELA 7</b> | Médias de área foliar de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 42 |
| <b>TABELA 8</b> | Média do teor de clorofila A e B (ICF) de plantas de soja no estágio V6, no experimento 1, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 44 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>TABELA 9</b>   | Análise química de parte aérea de plantas de soja, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                         | 45 |
| <b>TABELA 10</b>  | Análise química relacionada a massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 46 |
| <b>TABELA 11</b>  | Descrição dos tratamentos utilizados no experimento. UFU. Uberlândia, 2019.....   | 58 |
| <b>TABELA 12.</b> | Caracterização química da amostra do solo coletado. UFU. Uberlândia, 2019.....  | 58 |
| <b>TABELA 13</b>  | Altura média de plantas de soja (estádios R3 e R7), submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                        | 66 |
| <b>TABELA 14</b>  | Diâmetro médio do colo de plantas de soja, nos estádios R3 e R7 submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....            | 68 |
| <b>TABELA 15</b>  | Massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                               | 69 |
| <b>TABELA 16</b>  | Médias de área foliar de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                                   | 70 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>TABELA 17</b> | TABELA 17. Média do teor de clorofila A e B (ICF) de plantas de soja nos estádios V4, V5, V6 e R2, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....      | 73 |
| <b>TABELA 18</b> | Média do teor de Proteína Total Solúvel (PTS) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....          | 75 |
| <b>TABELA 19</b> | Média da atividade de superóxido dismutase (SOD) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....       | 78 |
| <b>TABELA 20</b> | Média da atividade de Catalase (CAT) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, no experimento 2, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 81 |
| <b>TABELA 21</b> | Média da atividade de Peroxidase (POD) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                 | 81 |
| <b>TABELA 22</b> | Média da atividade de Peroxidação Lipídica (PL) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....        | 85 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>TABELA 23</b> | Média da atividade do Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 87 |
| <b>TABELA 24</b> | Média da atividade de Prolina (PROL) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 90 |
| <b>TABELA 25</b> | Análise química de parte aérea de plantas de soja, submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 92 |
| <b>TABELA 26</b> | Análise química relacionada à massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 93 |
| <b>TABELA 27</b> | Massa de grãos (MG) e número médio de grãos por planta (NMGP), de plantas submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 95 |
| <b>TABELA 28</b> | Classificação em peneiras de 6,5; 6; 5,5; 5 e 4,4 mm, do número médio de sementes de plantas submetidas a diferentes doses de <i>A. brasilense</i> , com presença e ausência de <i>B. japonicum</i> , em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                                   | 96 |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>FIGURA 1</b>  | A) Disposição das sementes de soja, Cultivar AS3681IPRO e do fertilizante organomineral na semeadura. B) Vista geral do experimento, indicando vasos com duas plantas após o desbaste. Uberlândia – MG, 2019..... | 38 |
| <b>FIGURA 2</b>  | Escaneamento de folhas para obtenção de área foliar (LI-COR, modelo LI-3100C). Uberlândia – MG, 2019.....   | 38 |
| <b>FIGURA 3</b>  | Média da área foliar de plantas de soja na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 43 |
| <b>FIGURA 4</b>  | A) Disposição das sementes de soja, Cultivar AS3681IPRO e do fertilizante organomineral na semeadura. B) Vista geral do experimento. Uberlândia – MG, 2019.....   | 59 |
| <b>FIGURA 5</b>  | Escaneamento de folhas para obtenção de área foliar (LI-COR, modelo LI-3100C). Uberlândia – MG, 2019.....   | 60 |
| <b>FIGURA 6</b>  | Folhas coletadas para análise bioquímica A) embaladas em sacos plásticos identificados e B) envoltas por papel alumínio para armazenamento. Uberlândia – MG, 2019.....  | 61 |
| <b>FIGURA 7</b>  | Folhas coletadas e embaladas recebendo nitrogênio líquido. Uberlândia – MG, 2019.....   | 61 |
| <b>FIGURA 8</b>  | Altura de plantas de soja no estágio R7, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 67 |
| <b>FIGURA 9</b>  | Diâmetro médio do colo de plantas de soja no estágio R3, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 68 |
| <b>FIGURA 10</b> | Diâmetro médio do colo de plantas de soja no estágio R7, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....  | 69 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>FIGURA 11</b> | Média do teor de clorofila de plantas de soja no estádio V6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 55 |
| <b>FIGURA 12</b> | Média do teor de clorofila A de plantas de soja no estádio R2, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 74 |
| <b>FIGURA 13</b> | Média do teor de clorofila B de plantas de soja no estádio R2, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 74 |
| <b>FIGURA 14</b> | Média do teor de PTS de plantas de soja no estádio V3, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 76 |
| <b>FIGURA 15</b> | Média do teor de PTS de plantas de soja no estádio V6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 76 |
| <b>FIGURA 16</b> | Média do teor de PTS de plantas de soja no estádio R5, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 77 |
| <b>FIGURA 17</b> | Média do teor de SOD de plantas de soja no estádio V3, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 79 |
| <b>FIGURA 18</b> | Média do teor de SOD de plantas de soja no estádio V6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 79 |
| <b>FIGURA 19</b> | Média do teor de SOD de plantas de soja no estádio R2, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 80 |
| <b>FIGURA 20</b> | Média do teor de SOD de plantas de soja no estádio R6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....         | 80 |
| <b>FIGURA 21</b> | Média da atividade de POD de plantas de soja no estádio V3, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....    | 84 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>FIGURA 22</b> | Média da atividade de POD de plantas de soja no estádio V6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                           | 84 |
| <b>FIGURA 23</b> | Média da atividade de PL de plantas de soja no estádio R5, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                            | 86 |
| <b>FIGURA 24</b> | Média da atividade de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de plantas de soja no estádio V6, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 88 |
| <b>FIGURA 25</b> | Média da atividade de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de plantas de soja no estádio R5, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019..... | 88 |
| <b>FIGURA 26</b> | Média da atividade de PROL em plantas de soja no estádio V3, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                          | 91 |
| <b>FIGURA 27</b> | Média da atividade de PROL em plantas de soja no estádio R5, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                          | 91 |
| <b>FIGURA 28</b> | Média do teor de P em plantas de soja na maturação fisiológica, na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....                       | 94 |
| <b>FIGURA 29</b> | Massa de grãos de plantas de soja na presença de <i>A. brasilense</i> , com e sem inoculação de <i>B. japonicum</i> . UFU, Uberlândia-MG. 2019.....   | 96 |

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ABC                           | Agricultura de Baixa Emissão de Carbono                   |
| AF                            | Área Foliar   |
| ANOVA                         | Análise de Variância                                      |
| APX                           | Ascorbato Peroxidase                                      |
| BPCP                          | Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas            |
| CAT                           | Catalases   |
| CFSEMG                        | Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais |
| CONAB                         | Companhia Nacional de Abastecimento                       |
| CONAMA                        | Conselho Nacional de Meio Ambiente                        |
| CPA                           | Comprimento da Parte Aérea                                |
| CR                            | Comprimento de Radícula                                   |
| DMAE                          | Departamento Municipal de Água e Esgoto de Uberlândia     |
| EDTA                          | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético                        |
| EROs                          | Espécies Reativas de Oxigênio                             |
| FBN                           | Fixação Biológica de Nitrogênio                           |
| GPX                           | Glutathione Peroxidase                                    |
| GR                            | Glutathione Redutase                                      |
| GSTs                          | Glutathione S-transferase                                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrogênio                                    |
| ICF                           | Índice de Clorofila Falker                                |
| KI                            | Iodeto de Potássio  |
| MERCOSUL                      | Mercado Comum do Sul                                      |
| MDA                           | Molondialdeído  |
| MF                            | Massa Fresca  |
| MS                            | Massa de Sementes   |
| MSPA                          | Massa Seca de Parte Aérea                                 |
| MSR                           | Massa Seca de Radículas                                   |
| NBT                           | Nitro Blue Tetrazolium                                    |
| NMGP                          | Número Médio de Grãos por Planta                          |
| O <sub>2</sub> <sup>o-</sup>  | Radicais Superóxido                                       |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Oxigênio singleto   |
| <sup>o</sup> OH-              | Radicais Hidroxila  |

|       |  |
|-------|--|
| PL    | Peroxidação Lipídica                         |
| POD   | Peroxidases                                  |
| PROL  | Prolinas                                     |
| PTS   | Proteína Total Solúvel                       |
| RAS   | Regras para Análise de Sementes              |
| SOD   | Superóxido Dismutase                         |
| TBA   | Ácido Tiobarbitúrico                         |
| TBARS | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TCA   | Ácido Tricloroacético                        |
| UFU   | Universidade Federal de Uberlândia           |
| USDA  | United States Department of Agriculture      |
| UV    | Ultravioleta                                 |

## RESUMO GERAL

### BARROS, F. C. *Azospirillum brasilense* via fertilizante organomineral coinoculado com *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja

A simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas como a soja forma o mais importante sistema de fixação biológica de nitrogênio e vem sendo utilizada com sucesso, possibilitando uma economia muito expressiva em fertilizantes nitrogenados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do fertilizante organomineral como veículo de inoculação do *Azospirillum brasilense* e a influência da associação entre o *Bradyrhizobium japonicum* e *A. brasilense* no desenvolvimento da cultura da soja. Foram instalados três experimentos: o experimento 1 feito em laboratório, e os experimentos 2 e 3 em casa de vegetação, além disso, em todos os experimentos foi utilizada a cultivar AS 3680 IPRO. O experimento 1 consistiu em testes de germinação e de crescimento de plântulas de acordo com as prescrições das Regras para Análises de Sementes. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, com 5 repetições e 4 tratamentos (*B. japonicum*; *A. brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* e testemunha). Ademais, foram utilizadas as doses de 100 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes de soja de *A. brasilense* do produto Masterfix Gramíneas® L, cepas – AbV5 e AbV6 (2x10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>) e 100 mL ha<sup>-1</sup> de *B. japonicum* do produto Masterfix Soja® L, cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 (5x10<sup>9</sup> de células viáveis mL<sup>-1</sup>). O experimento 2 foi realizado em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 4×2 +1, correspondentes à quatro doses de *A. brasilense* do produto Masterfix Gramíneas® L (0, 100, 200 e 300 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes de soja), com e sem inoculação de *B. japonicum* do produto Masterfix Soja® L na dose 100 mL ha<sup>-1</sup> e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos. A parcela experimental foi constituída por dois vasos plásticos de 5 L e conduzido na casa de vegetação da Fazenda Capim Branco – UFU. O experimento 3 foi realizado em delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições, em esquema fatorial 4×2 +1, correspondentes à quatro doses de *A. brasilense* do produto Master Fix Gramíneas Líquido (0, 100, 200 e 300 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes de soja), com e sem inoculação de *B. japonicum* do produto Master Fix Soja Líquido, na dose 100 mL ha<sup>-1</sup> e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos. A parcela experimental consistiu de seis sacos de mudas com aproximadamente 8 L e conduzido na casa de vegetação do Campus Glória – UFU. O uso de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* inoculados isoladamente ou em coinoculação não interfere na germinação e crescimento de plântulas da cultivar de soja testada, porém confere proteção às plantas contra estresse.

**Palavras-chave:** Inoculação mista; Fixação biológica de nitrogênio; *Glycine max*; Bactérias promotoras de crescimento.

## GENERAL ABSTRACT

BARROS, F. C. *Azospirillum brasilense* by organomineral fertilizer coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum* in soybean crop.

The symbiosis between nitrogen-fixing bacteria and legumes, such as soybean, forms the most important biological nitrogen fixation system and it has been successfully used, making possible a very significant saving in nitrogen fertilizers. The objective of this work was to evaluate the effect of the association between *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean crop. Seed germination and seedling growth tests were installed in the laboratory according to the requirements of the Rules for Seed Analysis. The experimental design was in randomized blocks with 5 replicates and 4 treatments (*B. japonicum*; *A. brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* and control). Germination test evaluations were performed by counting the number of normal (strong and weak), abnormal (deformed and decayed) and dead seedlings. For the seedling growth test, it was evaluated the shoot length of seedlings, the radicle length of seedlings and the dry masses of shoot and rootlets. Two experiments were also carried out in a greenhouse, the first one using 5 L plastic pots at Fazenda Capim Branco - UFU, and the second using 8 L seedlings at Campus Glória - UFU. The experiments were conducted in a randomized block design in a  $4 \times 2 + 1$  factorial scheme, corresponding to four doses of a commercial product containing *A. brasilense* (0, 100, 200 and 300 mL  $50 \text{ kg}^{-1}$  of soybean seeds), with and without inoculation of commercial product with *B. japonicum* at a dose of  $100 \text{ mL ha}^{-1}$  and an additional treatment corresponding to the control (without inoculants or fertilizer), totaling nine treatments. Experiment 1 were conducted with four replicates and two pots per plot and experiment 2 was conducted with five replicates, six bags of molt per plot. The cultivar AS 3680 IPRO was used. Phenometric evaluations, antioxidant metabolism, chlorophyll A and B analyzes, chemical analyzes and productivity indicators were performed. The average germination, length, shoot dry mass and radicle obtained did not present significant difference. In experiment 1, isolated inoculation with *A. brasilense* showed increases for AP and AF variables. In experiment 2, the bacterium *A. brasilense*, in general, promoted physiological protection to the plants. The use of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, inoculated alone or in co-inoculation, did not interfere with germination and seedling growth of the tested soybean cultivar, but conferred protection to the plants against stress, which was not reflected in improvements in productivity indicators.

**Keywords:** Mixed inoculation; Biological nitrogen fixation; *Glycine max*; Growth promoting bacteria.

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, e o aumento da produtividade está associado, principalmente aos avanços tecnológicos, ao manejo e à eficiência dos produtores. Cultivada, especialmente, nas regiões Centro-Oeste e Sul do país, a soja se firmou como um dos produtos mais destacados na agricultura nacional e balança comercial.

No Brasil, a utilização de bactérias inoculantes em soja é uma prática amplamente utilizada, promovendo fixação biológica do nitrogênio (FBN), que é uma técnica utilizada com sucesso, uma vez que a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* possibilita uma economia expressiva em fertilizantes nitrogenados, além de disponibilizar nitrogênio para as culturas seguintes (HUNGRIA et al., 2007).

As bactérias utilizadas como inoculantes fazem parte de um grupo de micro-organismos conhecidos como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) que, além de promoverem a FBN, apresentam outros benefícios quando associadas às plantas e são capazes de promover o crescimento destas por meio de vários outros processos, incluindo: a) a produção de hormônios de crescimento (como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno), b) a capacidade de solubilizar fosfato e c) a indução de resistência sistêmica a doenças e estresses ambientais (HUNGRIA et al., 2010).

Os efeitos de vários estresses ambientais em plantas, incluindo a deficiência de N promovem espécies reativas de oxigênio (EROs), que inativam enzimas e danificam componentes celulares importantes. Para solucionar tais problemas, as plantas contêm um complexo sistema antioxidante para eliminar as EROs, incluindo enzimas antioxidantes. (BARTOLI, 2012; HERNÁNDEZ et al., 2001)

Um outro gênero dessas bactérias, o *Azospirillum*, tem sido utilizado mundialmente como inoculante (HUNGRIA et al., 2010). Este gênero engloba bactérias Gram-negativas que pertencem à subdivisão proteobacteria: são aeróbicas, não-fermentativas e vibróides (REIS et al., 2010). Pesquisas vêm indicando uma melhora no desempenho das culturas com a utilização de coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, contudo, torna-se necessário conduzir mais ensaios nas condições brasileiras.

O processo de inoculação tradicional consiste em aplicar as bactérias nas sementes, desta forma, logo após a germinação, as bactérias penetram na raiz e, logo após o processo de colonização, passam a fixar nitrogênio atmosférico. Apesar do tratamento de sementes se constituir em uma operação rotineira, alguns resultados de pesquisa têm mostrado que certos produtos quando aplicados nas sementes de algumas culturas podem, em determinadas situações, ocasionar redução na sobrevivência de organismos associados às sementes (DAN et al., 2011).

Tratamento com fungicidas e inseticidas nas sementes são práticas comuns na prevenção de danos causados por patógenos e insetos pragas, no entanto, é prejudicial à *Bradyrhizobium*. Segundo Andrés et. al. (1998), este micro-organismo sofre toxidez com o defensivo e pode deixar a cultura sem nodulação, dependendo do local de cultivo e do número de bactérias nativas presentes. No campo e em avaliações laboratoriais, foram verificadas reduções de até 98% na população de *Bradyrhizobium* quando as sementes foram tratadas com fungicidas, aos quais não são tolerantes, portanto, sua população é sensivelmente diminuída (HUNGRIA et al., 2007), podendo o mesmo ocorrer com *A. brasilense*.

Ao se trabalhar com micro-organismos, um bom condicionamento do solo é de fundamental importância para melhores resultados. A junção de materiais minerais e materiais orgânicos, chamado de fertilizante organomineral, apresenta vários benefícios, incluindo o de condicionador de solo, o que possibilita o aumento na produção das culturas devido à ação da matéria orgânica, favorecendo assim o melhor aproveitamento dos nutrientes minerais, além de conter substâncias húmicas que influenciam a quantidade e atividade dos micro-organismos do solo. Quando ocorre a ação dos micro-organismos do solo à matriz orgânica, ocorre a liberação gradual dos nutrientes, efeito este conhecido como liberação controlada ou *slow release*, característica mais marcante ainda se o fertilizante estiver peletizado (SOUSA, 2014).

Com o incremento gradual da fertilidade do solo, pode haver a estabilização dos nutrientes e aumento da produtividade, o que representa uma das maiores vantagens dos organominerais, quando em comparação com fertilizantes minerais, visto que, se os nutrientes forem imediatamente disponibilizados no solo, podem ser perdidos por volatilização, fixação ou lixiviação (PAULETTI et al., 2003).

As características apresentadas tornam o fertilizante organomineral um possível veículo para a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio, visto que não causa danos às raízes pela alta concentração de sais (MACHADO, 2016). Com isso, as bactérias estarão disponibilizadas próximo às raízes e não sofrerão com toxidez por defensivos agrícolas.

Vale ressaltar que a utilização de fertilizante organomineral apresenta maior gama de vantagens do que as encontradas em qualquer fonte isolada, seja o fertilizante mineral ou o orgânico, uma vez que o primeiro apresenta as características ótimas das duas fontes, que não podem ser alcançadas individualmente.

Objetivou-se com este trabalho verificar se há alteração na germinação de sementes e crescimento de plântulas; e no crescimento e desenvolvimento das plantas, além de observar ocorrência de incremento no metabolismo antioxidante e nos indicativos de produtividade. Sobretudo, avaliar a eficiência do fertilizante organomineral como veículo de inoculação do *A. brasilense* e a influência da associação entre o *B. japonicum* e *A. brasilense* no desenvolvimento da cultura da soja.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inoculação

Dentre os interesses existentes em torno da produção e comercialização da soja, o teor elevado de proteína dos grãos tem papel de destaque, o que faz com que a planta apresente alta exigência em nitrogênio (N). Segundo Hungria (2011), para se produzir 1.000 kg de grãos, a soja necessita, em média, de 65 kg de N, além de cerca de 15 kg de N alocados nas folhas, caules e raízes, resultando em um total de 80 kg de N. Assim, a produção de 3.000 kg ha<sup>-1</sup>, média dos produtores brasileiros, demanda cerca de 240 kg de N.

Devido ao custo elevado de fertilizantes nitrogenados, há mais de 50 anos são conduzidos, no Brasil, na Argentina e, mais recentemente, em outros países produtores da América do Sul, pesquisas de melhoramento e/ou avaliação de cultivares de soja e estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* visando identificar as condições em que o N necessário às plantas possa ser fornecido via fixação biológica do nitrogênio

atmosférico (N<sub>2</sub>), apresentando grandes vantagens econômicas para os países e viabilizando economicamente a cultura da soja no MERCOSUL (HUNGRIA, 2011).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira estão associados aos avanços científicos que disponibilizaram tecnologias ao setor produtivo. Para tanto, foram selecionadas pela pesquisa estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio para o desenvolvimento de inoculantes com elevada eficiência simbiótica, associado ao uso de cultivares de soja responsivas à inoculação e à melhoria na qualidade dos inoculantes produzidos, resultando na independência da cultura em relação aos fertilizantes nitrogenados (MERCANTE et al., 2011).

Ressalta-se que o inoculante que chega aos sojicultores para o procedimento de inoculação deve ser utilizado anualmente para maximizar os benefícios proporcionados pela bactéria, resultando em incrementos médios no rendimento de soja da ordem de 8% (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2014). A inoculação (reinoculação) é necessária pois, no período de entressafra de soja, ocorre competição entre bactérias fixadoras do nitrogênio e outros microrganismos nativos da área agrícola, reduzindo a população de bactérias fixadoras de nitrogênio, que são menos adaptadas às variações ambientais (CÂMARA, 2014; GITTI, 2016).

É muito importante lembrar que os inoculantes são bactérias vivas e as recomendações de manejo devem ser rigorosamente seguidas, para evitar perda de viabilidade. Cuidado com o armazenamento e transporte também são muito importantes, então devem ser feitos em condições adequadas de temperatura e arejamento. A inoculação deve ser realizada à sombra, protegido de calor e luz solar; e a semeadura deve ocorrer o mais breve possível (GITTI; ROSCOE, 2017).

É incontestável a contribuição da fixação biológica para a cultura da soja no MERCOSUL, internacionalmente reconhecido e considerado um exemplo de sucesso. Tais resultados se devem, principalmente, à perseverança de pesquisadores e difusores de tecnologia em procurar alternativas ecologicamente corretas e de baixo custo para o agricultor (HUNGRIA, 2011).

Além da economia estimada pelo processo biológico com a cultura da soja, em torno de US\$ 7 bilhões anuais somente no Brasil, existem, ainda, ganhos ambientais pela menor poluição de lagos, rios e lençóis freáticos pelo nitrato, evitando futuros investimentos na despoluição ambiental, bem como a menor emissão de gases de efeito

estufa, ambos efeitos colaterais da síntese e uso de fertilizantes químicos. Essas tecnologias estão em plena sintonia com as metas do governo brasileiro, do Plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono) (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA; NOGUEIRA, 2014).

## 2.2 Coinoculação

A técnica de coinoculação consiste na utilização de combinações de diferentes micro-organismos, que produzem um efeito sinérgico, isto é, que superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos micro-organismos utilizados de forma isolada (BÁRBARO et al., 2008; FERLINI, 2006).

Assim, produtos à base de *Azospirillum brasilense* têm sido estudados para coinoculação de soja, juntamente com *Bradyrhizobium*, em países como Argentina e África do Sul. Têm sido observados a potencialização da nodulação e o maior crescimento radicular, em resposta à interação positiva entre as bactérias simbióticas (*Bradyrhizobium*) e as bactérias diazotróficas, em especial as pertencentes ao gênero *Azospirillum* (FERLINI, 2006).

Várias pesquisas reportam os benefícios da tecnologia de coinoculação (ou inoculação mista) de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* com *Azospirillum brasilense* (BÁRBARO et al., 2008; BÁRBARO et al., 2009; BÁRBARO et al., 2011; BÁRBARO-TORNELI et al., 2017), demonstrando incrementos nos rendimentos das leguminosas com a coinoculação, obtendo-se valores superiores aos obtidos com a inoculação de *Bradyrhizobium* de forma isolada (BURDMANN; HAMAQUI; OKON, 2000).

Garcia (2015) também constatou respostas positivas, demonstrando que a inoculação da soja com *Azospirillum brasilense*, isolada ou em coinoculação, influencia significativamente o desempenho morfofisiológico das raízes e proporciona maior nodulação pelas plantas da soja. Desse modo, além de ambientalmente sustentável, a coinoculação é uma tecnologia altamente rentável para o agricultor (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2014).

Os mecanismos de ação do *Bradyrhizobium* e do *Azospirillum* são distintos. No caso deste, os benefícios advêm, principalmente, da produção de fitormônios, com grande impacto no crescimento das raízes (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2014). Um melhor ajuste das relações água-planta por vários mecanismos (maior área de vasos de xilema, maior

condutividade hidráulica específica da haste, hastes mais grossas) foram observadas por Romero et al. (2014), características que aliviaram de forma transitória a expressão dos sintomas de uma doença vascular em tomateiro.

No entanto, alguns resultados obtidos por pesquisadores a partir de combinações de micro-organismos inoculantes em plantas leguminosas se mostram contraditórios, podendo tanto estimular quanto inibir a formação de nódulos e crescimento de raízes, variando em função do nível de concentração do inóculo e forma de inoculação (BÁRBARO et al., 2008), como, por exemplo, Gitti et al. (2012), Zuffo et al. (2015), Zuffo et al. (2016) e Finoto et al. (2017), que não evidenciaram resposta ao uso dessa prática.

### **2.3 Estado Nutricional**

Dentre os vários benefícios proporcionados pela coinoculação está o aumento da área radicular, que possibilita maior aproveitamento dos nutrientes do solo e fertilizantes e, como consequência, é possível observar maior vigor das plantas e equilíbrio nutricional (EMBRAPA, 2014).

Cabe ainda observar que o maior desenvolvimento radicular com *Azospirillum* também resulta em maior nodulação e, conseqüentemente, maior contribuição da fixação biológica do nitrogênio. Seu uso reduz o aporte de fertilizantes minerais, particularmente os nitrogenados, reduzindo o gasto com insumos. Durante a safra, os rizóbios contribuem com o suprimento de nitrogênio e os benefícios adicionais pela coinoculação com *Azospirillum* e incluem o melhor estado nutricional das plantas e maior tolerância a estresses abióticos, como a seca (EMBRAPA, 2014).

Em trabalho sobre a influência da coinoculação da soja nos atributos químicos de latossolo vermelho distrófico, Nóbile et al. (2017) relatou que um maior equilíbrio nutricional foi observado nas plantas de soja com a coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*.

Estimativas apontam para contribuições da fixação biológica do nitrogênio (FBN) da ordem de mais de 300 kg de nitrogênio ha<sup>-1</sup>, além da liberação de 20-30 kg nitrogênio ha<sup>-1</sup> para a cultura seguinte (HUNGRIA et al., 2007).

## 2.4 Estresse oxidativo em plantas

As plantas, ao serem submetidas a estresses ambientais - elevadas ou baixas temperaturas, seca, salinidade, radiação ultravioleta, ozônio e infecções - podem sofrer potenciais prejuízos, ocasionando superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (APEL; HIRT, 2004; FOYER; NOCTOR, 2005). Como exemplos de EROs podemos citar radicais superóxido ( $O_2^{\circ-}$ ), radicais hidroxila ( $^{\circ}OH$ -), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (SCANDALIOS, 2005).

Os radicais livres são essenciais para muitos processos biológicos e estão envolvidos no ciclo da oxigenase e da lipogênese. Contudo, se estes não são controlados, podem tornar-se destrutivos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados das membranas e alterar a sua funcionalidade, diminuir a capacidade de fixação de carbono em cloroplastos, promover peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos (GOODMAN, 1994; MEHDY, 1994; SCANDALIOS, 1993).

Para evitar o acúmulo das EROs, as plantas possuem sistemas de defesa antioxidantes eficientes, não-enzimáticos: a) vitaminas C e E, b) glutathiona (GSH), c)  $\beta$ -caroteno, d) compostos fenólicos, e) tocoferóis e f) prolínas (PROL); e enzimáticos: a) enzimas superóxido dismutase (SOD), b) catalases (CAT), c) peroxidases (POD), d) glutathiona peroxidase (GPX), e) ascorbato peroxidase (APX), f) glutathiona redutase (GR) e g) glutathiona S-transferase (GSTs) (SCANDALIOS, 2005). Este sistema de defesa permite a eliminação dessas espécies reativas e a proteção contra os danos oxidativos (FAGAN et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2001).

A SOD é uma metalo-enzima considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, que catalisa a dismutação de dois radicais  $O_2^{\circ-}$ , gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Essas enzimas participam da modulação do nível de  $H_2O_2$  em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; MITTLER, 2002).

A CAT é uma das principais enzimas na eliminação do  $H_2O_2$ , atuando nos peroxissomos, glioxissomos e também em mitocôndrias. Ela converte duas moléculas de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e oxigênio molecular (HELDT; PIECHULLA, 2011).

A POD localiza-se, principalmente, na parede celular e no vacúolo. Sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos e abióticos (PIZA et al., 2003).

A acumulação de prolina é uma das respostas mais comuns ao estresse hídrico nas plantas ao desempenhar um papel como osmoprotetor e um soluto compatível (SHARMA et al., 2012).

## 2.5 Fertilizante Organomineral

O organomineral surge como uma alternativa para a disposição racional de resíduos orgânicos e o uso dos nutrientes contidos nesses resíduos, sendo a primeira grande vantagem relativa desses fertilizantes em relação aos minerais o fato de utilizarem como matéria-prima resíduos que são passivos ambientais de outros sistemas de produção (BENITES et al., 2010).

O fertilizante organomineral é definido como sendo o produto resultante da mistura física ou combinação de fertilizantes orgânicos e minerais, segundo o Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004) e Instrução Normativa Nº 23, de 31 de agosto de 2005, da legislação brasileira. O Capítulo III da Instrução Normativa Nº 25, de 23 de julho de 2009, seção V, Art. 8º, § 1º, estabelece as especificações, características e garantias dos fertilizantes organominerais sólidos para aplicação no solo, e estes devem apresentar, no mínimo: carbono orgânico: 8%; CTC: 80 mmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; macronutrientes primários isolados (N, P, K) ou em misturas (NP, NK, PK ou NPK): 10%; macronutrientes secundários: 5% e umidade máxima de 30%.

De acordo com o Decreto nº 8.059, de 26 de julho de 2013, os fertilizantes organominerais devem passar por um controle de laboratório, determinando-se a composição química e confirmando as exigências especificadas (BRASIL, 2013).

Esse tipo de fertilizante pode ser desenvolvido a partir de matérias-primas como esterco, turfa, resíduos da indústria sucroalcooleira, farinhas de ossos e sangue, tortas diversas, resíduos agroindustriais e lodo de esgoto (ABISOLO, 2010; RAMOS et al., 2017); e podem ser comercializadas nas formas de farelo, *pellets* ou grânulos (ABISOLO, 2016).

Os fertilizantes granulados apresentam maior aceitação no mercado, pois é um produto com maior resistência mecânica, maior fluidez e menor teor de umidade, porém de produção mais complexa e cara. Já o fertilizante na forma de *pellets* apresenta vantagens operacionais e financeiras, tendo por essa razão preferência na produção. Em

contrapartida, o fertilizante comercializado na forma farelada proporciona menor agregação de valor em relação aos *pellets* e grânulos (ABISOLO, 2016).

O processo de peletização por extrusão é um processo pelo qual o fertilizante é submetido à alta pressão, umidade e temperatura em curto espaço de tempo (OLIVEIRA, 2014), produzindo *pellets* com elevado grau de rigidez ( $8,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ ), adquirindo alta resistência à fragmentação, evitando segregação dos componentes (TEIXEIRA, 2013).

Com relação às vantagens da utilização do fertilizante organomineral, cita-se a redução da adsorção de fósforo no sistema coloidal do solo, melhorando assim a interação da planta com o mineral (PARENT et al, 2003); efeitos fisiológicos em função da presença de substâncias húmicas, além dos precursores hormonais, como o triptofano (ABISOLO, 2017); melhoria da qualidade do solo pelo efeito condicionador da matéria orgânica (SILVA; 2008) e aumento da atividade microbiana no entorno da área de aplicação do fertilizante organomineral devido ao fornecimento de condições de desenvolvimento destes micro-organismos. Bertechini (2017), estudando as frações da matéria orgânica do solo, constatou que o uso de fertilizantes organominerais incrementou os teores de carbono orgânico total, frações lábeis e húmicas na sucessão milho-soja em solos do Cerrado piauiense.

Podem ainda ocorrer efeitos adicionais sobre o crescimento de raízes, promovidos por compostos orgânicos presentes no fertilizante organomineral (BENITES, et al., 2010), manter ou aumentar a porosidade do solo e retenção de água, além de promover agregação do solo (RAMOS et al., 2017). Ademais, o organomineral peletizado possui uma solubilização gradativa no decorrer do período de desenvolvimento da cultura, aumentando sua eficiência agrônômica se comparado às fontes minerais solúveis (KIEHL, 2008).

Em estudo sobre eficiência de fertilizantes em soja, Almeida Júnior et al. (2017) verificaram que a fertilização com organomineral proporcionou maior incremento na produção de soja em todas as doses, com relação ao fertilizante mineral, verificando assim a viabilidade de seu uso na produção agrícola na cultura. Oliveira et al. (2017) também demonstrou uma superioridade de resultados com o uso de fertilizante organomineral na cultura do sorgo, bem como Resende Júnior et al. (2016), que verificaram aumento de matéria fresca em Capim-Marandu com o uso de organomineral.

Para a cultura da batata na safra chuvosa e de inverno, o organomineral demonstrou-se eficiente, apresentando um incremento 120% maior que a fonte mineral, além de maior qualidade de tubérculos (CARDOSO et al., 2017),

Embora o fortalecimento do setor de fertilizantes organominerais não seja uma ação que reverta a dependência externa brasileira por fertilizantes e nem impacte diretamente a formação dos preços dos fertilizantes, os fatores ambientais e socioeconômicos relacionados a essa atividade justificam a adoção de medidas estratégicas que estimulem esse setor (FAO, 2010).

## **2.6 Lodo de Esgoto**

O crescimento populacional proporciona aumento da quantidade gerada de lodo de esgoto e, em consequência, aumento dos serviços de coleta e tratamento de esgoto. Em 2010, estimativas apontavam uma produção nacional de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca por ano, considerando que apenas 30% do esgoto da população urbana seria tratado (PEDROZA et al., 2010).

Os esgotos sanitários constituem sérios problemas ambientais, sendo que, do tratamento do esgoto, gera-se um subproduto (podendo ser originado do tratamento de esgotos domésticos e industriais) denominado lodo de esgoto ou biossólido (quando tratado e processado). Tais resíduos exigem áreas cada vez maiores para descarte, além do problema ambiental que a ausência de tratamento adequado pode causar à área onde é depositado (RIGO et al., 2014).

A utilização agrícola do lodo de esgoto é a melhor forma de disposição final deste resíduo, uma vez que permite o fechamento do ciclo dos nutrientes minerais (ANTILLE et al., 2017; BETTIOL; CAMARGO, 2006), além de evitar custos associados a outras rotas de descarte (DELIN, 2016; LAGAE et al., 2009).

O preparo do lodo de esgoto como matéria prima requer a separação mecânica da fase sólida contida na pasta e o tratamento químico com cal virgem e solarização (ALVES FILHO et al., 2016), tornando este subproduto livre de contaminação química e biológica. A partir deste tratamento de higienização, o lodo de esgoto é então denominado biossólido, estando viável para uso na agricultura.

No entanto, este reaproveitamento agrícola do lodo de esgoto exige que as suas características químicas e biológicas garantam a segurança ambiental e sanitária da

população. Por essa razão, os critérios determinados pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), na Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006 devem ser seguidos a fim de atender os critérios e procedimentos para uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário (CONAMA, 2006).

Um aspecto fundamental é que materiais fertilizantes podem ser produzidos a partir do lodo de esgoto, ajustando-se os índices N-P-K para se adequarem aos requisitos específicos para a cultura e o solo. Isso elimina algumas das limitações comumente encontradas com o uso de biossólidos, incluindo: composição química variável e propriedades físicas inadequadas para uma melhor aplicação (LANDRY et al., 2006). O fertilizante organomineral formado apresenta melhor potencial de aproveitamento de nutrientes e facilidade de manuseio e aplicação de campo eficiente.

Em estudos realizados por Antille et al. (2017), foi verificado que o fósforo assimilável aumentou com o uso de biossólidos e que os metais pesados no solo não foram afetados pelo tratamento com fertilizante organomineral feito à base de lodo de esgoto. Concluíram, portanto, que o uso desse tipo de fertilizante para a produção de trigo de inverno trouxe benefícios, sendo uma alternativa sustentável para a reciclagem de biossólidos.

Resende Júnior et al. (2016) também encontraram resultados satisfatórios, concluindo que o uso de lodo de esgoto calcinado proporciona benefícios agrônômicos, e a sua aplicação em terras agrícolas, conforme exigido pela legislação ambiental, pode produzir benefícios sociais e ambientais com menor impacto na saúde pública e meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA EM NUTRIÇÃO VEGETAL. **Plano Nacional de Biomassa. 44ª Reunião da Câmara Temática de Insumos Agropecuários – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.** São Paulo: ABISOLO, 2009. Palestra técnica, 16 novembro, 2009. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/camaras-tematicas-1/insumos-agropecuarios>. Acesso em: 15 dez 2015.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA EM NUTRIÇÃO VEGETAL. São Paulo: ABISOLO, 2017. Disponível em: <https://abisolo.com.br/anuario-edicoes-anteriores/>. Acesso em: 16 nov 2018.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA EM NUTRIÇÃO VEGETAL. São Paulo: ABISOLO, 2016. Disponível em: <https://abisolo.com.br/anuario-edicoes-anteriores/>. Acesso em: 16 nov. 2018.

ALMEIDA JUNIOR, J. J.; SMILJANIC, K. B. A.; MATOS, F. S. A.; JUSTINO, P. R. V.; SILVA, W.T. R.; CREMONESE, H. S. Utilização de adubação organomineral na cultura da soja. *In: COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR*, 2, 2017, Mineiros. **Anais [...]**. Mineiros: Centro Universitário de Mineiros, 2017. Disponível em: <http://www.unifimes.edu.br/ojs/index.php/coloquio/article/view/216>. Acesso em: 22 out. 2018.

ALVES FILHO, A.; CAMARGO, R.; LANA, R. M. Q.; MORAES, M. R. B.; MALDONADO, A. C. D.; ATARASI, R. T. Treatment of sewage sludge with the use of solarization and sanitizing products for agricultural purposes. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 11, n. 3, p. 184-191, Jan., 2016. DOI: 10.5897/AJAR2015.10571. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/944e/1d3a856b6fc1318d2c2d0199b5ebcd8a57ae.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2017.

ANDRÉS J.A.; CORREA, N. S.; ROSAS S. B. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, n. 2, p.140-146, 1998. DOI: 10.1007/s003740050357. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s003740050357>. Acesso em: 27 nov. 2018.

ANTILLE, D. L.; GODWIN, R. J.; SAKRABANI, R.; SENEWEERA, S.; TYRREL, S. F.; JOHNSTON, A. E. Field-scale evaluation of biosolids-derived organomineral fertilizers applied to winter wheat in england. **Agronomy Journal**, Madison, v. 109, n. 2, p. 654-674, 2017. DOI: 10.2134/agronj2016.09.0495. Disponível em: <https://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/11597>. Acesso em: 14 set. 2018.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Gray, v. 55, n. 123, p. 373-399, 2004. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377225>. Acesso em: 04 ago. 2018.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum e Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. *In: INFOBIBOS – Informações Tecnológicas*. **INFOBIBOS**. Campinas: INFOBIBOS, 2008. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm). Acesso em: 14 set. 2018.

BÁRBARO, I.M.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MACHADO, P. C.; MIGUEL, F. B. Resultados preliminares da co-inoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: <http://aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2011/2011-julho-dezembro/853-resultados-preliminares-da-co-inoculacao-de-azospirillum-juntamente-com-bradyrhizobium-em-soja.html>. Acesso em: 22 jun. 2017.

BÁRBARO, I.M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 01-07. 2009. DOI: 10.5747/ca.2009.v05.n1.a0040. Disponível em: <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/372/510>. Acesso em: 14 set 2018.

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da; LIBÓRIO, P. H. da S.; MASSARO SOBRINHO, R.; FINOTO, E. L.; MATEUS, G. P.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R. S. de. Viabilidade técnica e econômica da co-inoculação de soja no Estado de São Paulo. **Nucleus**, Ituverava, p.45-58, 2017. (Edição Especial). DOI: 10.3738/1982.2278.2819. Disponível em: <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/2819/2484>. Acesso em: 15 out 2018.

BARTOLI, C. G.; CASALONGUE, C. A.; SIMONTACCHI, M.; MARQUEZ-GARCIA, B.; FOYER, C.H. Interactions between Hormone and Redox Signalling Pathways in the Control of Growth and Cross Tolerance to Stress. **Environmental and Experimental Botany**, n. 93, p. 73-88. 2012. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.05.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847212001165>. Acesso em: 20 out. 2018.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. *In*: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BENITES, V. de M.; CORREA, J. C.; MENEZES, J. F. S.; POLIDORO, J. C. Produção de fertilizante organomineral granulado a partir de dejetos de suínos e aves no Brasil. REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro**: anais. Viçosa: SBCS, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98406/1/Producao-de-fertilizantespdf.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.

BERTECHINI, M. C. **Frações da matéria orgânica do solo em função de fontes e doses de fertilizante mineral e organomineral no cerrado piauiense**. 2017. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004**. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2004. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2004/Decreto/D4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Decreto/D4954.htm). Acesso em: 12 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.23, de 31 de agosto de 2005**. Aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2005. Disponível em: [http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN\\_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd](http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd). Acesso em 12 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa sda n. 25, de 23 de julho de 2009**. Aprova as normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-25-de-23-7-2009-fertilizantes-organicos.pdf/view> . Acesso em 12 fev. 2017.

BRASIL. Decreto nº 8.059, de 26 de julho de 2013. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF, 2013. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2013/decreto/D8059.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2013/decreto/D8059.htm). Acesso em: 12 fev. 2017.

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

CÂMARA, G. M. S. Fixação Biológica de nitrogênio em soja. **IPNI – International Plant Nutrition Institute**. Informações agronômicas, n. 147, 2014. Disponível em: [http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/B7FB85D4FAD745CF83257D660046A90D/\\$FILE/Page1-9-147.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/B7FB85D4FAD745CF83257D660046A90D/$FILE/Page1-9-147.pdf). Acesso em: 23 ago. 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, DF: CONAMA, 2006. Disponível em:

<http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf> . Acesso em: 24 out. 2018.

DAN, L.G. de. M.; DAN, H. de A.; PICCININ, G. G.; RICCI, T. T.; ORTIZ, A. H. T. Tratamento de sementes com inseticida e a qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 45-51, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/2073>. Acesso em: 10 de maio 2016.

DELIN, S. Fertilizer value of phosphorus in different residues. **Soil Use and Management**. 32(1):17-26. 2016. doi:10.1111/sum.12227. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/sum.12227>. Acesso em: 26 set 2018.

EMBRAPA. **Coinoculação nas culturas da soja e feijoeiro**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2014. (Soluções Tecnológicas. Prática Agropecuária). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2648/coinoculacao-nas-culturas-da-soja-e-feijoeiro>. Acesso em: 10 abr 2019.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nation**. Disponível no site. Disponível em: <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>. Acesso em: 20 jan de 2015.

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SOARES, L. H.; DURVAL NETO, D. **Fisiologia Vegetal: Metabolismo e nutrição mineral**. São Paulo, 2016.

FERLINI, H. A. Co-inoculación en soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Santa Fé, **Engormix**, 2006. Disponível em: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>. Acesso em: 25 ago. 2015.

FINOTO, E. L.; CORDEIRO JÚNIOR, 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. **Nucleus**, Ituverava, p. 9-14, 2017. (Edição Especial). DOI: 10.3738/1982.2278.2815. Disponível em: <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/2815>. Acesso em: 15 out de 2018.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, Reino Unido, v. 28, p. 1056-71, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>. Acesso em: 27 nov. 2018.

GARCIA, A. 2015. **Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade fisiológica de sementes de soja**. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia. Universidade

Estadual Paulista, Ilha Solteira. 2015. Disponível em:  
<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138390/000864065.pdf?sequence=1>> Acesso em: 27 jun de 2017.

GAZIRE, S. **Avaliação técnica e econômica das tecnologias disponíveis para produção de fertilizantes organominerais**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2016.

GITTI, D. C. Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja. *In*: MELOTTO, A. M.; LOURENÇÃO, A. L. F.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; GRIGOLLI, J. F. J. (ed.). **Tecnologia e Produção Soja 2015/2016**. Maracaju: Fundação MS, 2016. p. 15-24. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br:8080/anuario-tecnologia-e-producao-soja-2015-2016>. Acesso em: 03 out. 2018.

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINIET, D. C. D. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 5, n. 15, p. 36-46, 2012. Disponível em:  
<http://ojs.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/1297>. Acesso em: 05out. 2018.

GITTI, D. C.; ROSCOE, R. Manejo e Fertilidade do Solo para a Cultura da Soja. *In*: LOURENÇÃO, A. L. F.; BEZERRA, A. R. G.; GRIGOLLI, J. F. J.; GITTI, D. de C.; MELOTTO, A. M. (ed.). **Tecnologia e Produção Soja 2016/2017**. Maracaju: Fundação MS, 2017. p. 16-45. Disponível em:  
<http://www.fundacaoms.org.br:8080/publicacoes/tecnologia-e-producao-soja-2016-2017>. Acesso em: 04 out. 2018.

GOODMAN, B. The involvement of oxygen-derived free radicals in plant–pathogen interactions. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**. Section B. Biological Sciences, Cambridge, v.102, p. 479-493, 1994. DOI: 10.1017/S0269727000014500. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-royal-society-of-edinburgh-section-b-biological-sciences/article/involvement-of-oxygenderived-free-radicals-in-plantpathogen-interactions/D18C417683A8F17729CD39DE12D645CD>. Acesso em: 22 nov. 2018.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. *In*: HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**, San Diego: Academic, p. 431–449, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-384986-1.00018-1. Disponível em: <https://sci-hub.tw/10.1016/B978-0-12-384986-1.00018-1>. Acesso em: 13 dez. 2018.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 827-831, 2001. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129254/>. Acesso em: 11 dez. 2018.

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. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/468512/a-importancia-do-processo-de-fixacao-biologica-do-nitrogenio-para-a-cultura-da-soja-componente-essencial-para-a-competitividade-do-produto-brasileiro>. Acesso em: 22 ago. 2018.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Crawley, v.331, n. 1-2, p.413-425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 06 maio 2017.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologia de coinoculação: rizobium e Azospirillum em soja e feijoeiro.** EMPRAPA SOJA, 2014. Folders. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/984365/tecnologia-de-coinoculacao-rizobios-e-azospirillum-em-soja-e-feijoeiro>. Acesso em 14 set. 2018.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes organominerais.** 2. ed. Ed. Degaspari, Piracicaba, 160 p. 2008.

LAGAE, H.J.; LANGEMEIER, M.; LYBECKER, D.; BARBARICK, K. Economic value of biosolids in a semiarid agroecosystem. **Agronomy Journal**, Madison, v. 101, n. 4, p. 933-939. 2009. DOI:10.2134/agronj2008.0209x. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/aj/abstracts/101/4/933>; Acesso em: 10 jan 2017.

LANDRY, H.; THIRION, F.; LAGUE, C.; ROBERGE, M. Numerical modeling of the flow of organic fertilizers in land application equipment. **Computers and Electronics in Agriculture**. v. 51, n; 1-2, p. 35-53, 2006. DOI: 10.1016/j.compag.2005.11.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169905001766>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 2, p. 467-472, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159383/>. Acesso em: 02 dez. 2018.

MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. de C.; REIS JÚNIOR, F. B. dos. Estratégias para Aumentar a Eficiência de Inoculantes Microbianos na Cultura da Soja. Dourados, MS: **EMBRAPA - Comunicado Técnico 169.** 2011. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/15439527.pdf>. Acesso em: 07 maio 2017.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Maryland Heights, v. 9, p. 405-410, 2002. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138502023129>. Acesso em: 02 dez. 2018.

NÓBILE, F. O. de; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; SOPA, L; LIBÓRIO, P. H. da S. Influência da co-inoculação da soja nos atributos químicos de latossolo vermelho

distrófico. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC’2017**. Belém-PA, 2017.

OLIVEIRA, G. R. **Validação do processo de digestão e de peletização de cama de aviário para a produção de fertilizante organomineral**. 2014. 211 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/36109> Acesso em: 18 out. de 2018.

OLIVEIRA, D. P.; CAMARGO, R. de; LEMES, E. M.; LANA, R. M. Q.; MATOS, A. L. A.; MAGELA, M. L. M. Organic matter sources in the composition of pelletized organomineral fertilizers used in sorghum crops. *African Journal of Agricultural Research*, Nairobi, v. 12, p. 2574-2581, 2017. DOI: 10.5897/AJAR2016.11476. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/ACDC03D65521>. Acesso em 10 out. 2018.

PAULETTI, V.; L, M. R. de; BARCIK, C.; BITTENCOURT, A. Rendimento de grãos de milho e soja em uma sucessão cultural de oito anos sob diferentes sistemas de manejo de solo e de culturas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.3, p. 491-495, 2003. DOI: 10.1590/S0103-84782003000300015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782003000300015&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782003000300015&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 17 nov. 2018.

PIZA, I.M.T. et al. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 9, n.4, p.361-366, 2003. DOI: 10.18539/CAST.V9I4.661. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/661>. Acesso em: 23 dez. 2018.

RAMOS, L. A.; LANA, R. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H.; SILVA, A. A. Effect of organo-mineral fertilizer and poultry litter waste on sugarcane yield and some plant and soil chemical properties. *African Journal of Agricultural Research*, Grahamstown, v. 12, n. 1, p. 20-27, 2017. DOI: 10.5897/AJAR2016.11024. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/73BA66F62253>. Acesso em: 27 jul. 2018.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum***. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 20 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/884045/o-genero-azospirillum-diversidade-e-relacao-filogenetica-das-especies>. Acesso em: 26 mar. 2016.

RESENDE JUNIOR, J. C.; CAMARGO, R.; LANA, R. M. Q.; ALVES FILHO, A.; MATOS, A. L. A. The effects of sewage sludge, mineral and organic fertilizers on initial growth of *Urochloa brizantha* cv Marandu (Hochst. ex A. Rich.) R.D Webster. *African Journal of Agricultural Research*, Grahamstown, v. 11, p. 3460-3470, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11477. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/F76B37760344>. Acesso em: 20 jun. 2017.

RIGO, M. M.; RAMOS, R. R.; CERQUEIRA, A. A.; SOUZA, P. S. A.; MARQUES, M. R. C. Destinação e reuso na agricultura do lodo de esgoto derivado do tratamento de águas residuárias domésticas no Brasil. **Revista Gaia Scientia**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 174-186. 2014. Disponível em: <http://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/viewFile/17550/11550>. Acesso em: 22 jan. 2018.

ROMERO, A.M.; D. VEGA, D.; CORREA, O. S. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. **Applied Soil Ecology** v. 82. p. 38-43, 2014. DOI: 10.1016/j.apsoil.2014.05.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092913931400167X>. Acesso em: 30 maio 2017.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005. DOI: 10.1590/S0100-879X2005000700003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2005000700003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2005000700003). Acesso em: 21 dez. 2018.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.7-12, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158641/pdf/1010007.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2018.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, n. 1, p. 1-26, 2012. DOI: 10.1155/2012/217037. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/>. Acesso em: 17 dez. 2018.

SOUZA, R. T. X. de. **Fertilizante organomineral para a produção de cana-de-açúcar**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

TEIXEIRA, W. G. **Biodisponibilidade de fósforo e potássio provenientes de fertilizantes mineral e organomineral**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

ZUFFO, A.M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; Neto, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 87-93. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v38n1/v38n1a13.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2018.

ZUFFO, A. M.; BRUZI, A. T; REZENDE, P. M. de; BIANCHI, M. C.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; RIBEIRO, A. B. M.; VILELA, G. L. D. Morphoagronomic and productive traits of RR® soybean due to inoculation via *Azospirillum brasilense* groove. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.13, p. 438-444. 2016. DOI: 10.5897/AJMR2015.7682. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/77E89EA57922>. Acesso em: 12 jan. 2019.

## CAPÍTULO 2

## RESUMO

### BARROS, F. C. Coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em teste de germinação e crescimento de plântulas de soja

A soja é uma cultura agrícola de grande importância para o Brasil, sendo que a fixação biológica do nitrogênio vem sendo utilizada com sucesso, possibilitando uma economia muito expressiva em fertilizantes nitrogenados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação entre o *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na germinação e crescimento inicial de plântulas de soja. Foram instalados testes de germinação e de crescimento de plântulas em laboratório de acordo com as prescrições das Regras para Análises de Sementes. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com 5 repetições e 4 tratamentos (*B. japonicum*; *A. brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* e testemunha sem inoculação). As avaliações do teste de germinação foram feitas por meio da contagem do número de plântulas normais (fortes e fracas), anormais (deformadas e deterioradas) e mortas. Para o teste de crescimento de plântulas, foram avaliados o comprimento de parte aérea e radícula das plântulas; e massa seca de parte aérea e radículas. As médias de germinação obtidas não apresentaram diferença significativa em nenhuma das variáveis. Para o comprimento e massa seca de parte aérea e radícula obtidos a partir do teste de crescimento de plântulas, também não houve diferença significativa. *Bradyrhizobium japonicum*, isolado ou coinoculado com *Azospirillum brasilense*, não altera a germinação de sementes e o crescimento de plântulas da cultivar de soja testada.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras de crescimento; fixação biológica de nitrogênio; inoculação mista; *Glycine max*;

## ABSTRACT

BARROS, F. C. **Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on Germination and Seedling Initial Growth of Soybean.**

The objective of this work was to evaluate the effect of the association between *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on the germination and initial growth of soybean seedlings. Tests of seed germination and seedling growth were conducted in the laboratory according to the requirements of the Rules for Seed Analysis. The experimental design consisted of randomized blocks with five replicates and four treatments (*B. japonicum*; *A. brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* and control). Germination test evaluations were performed by counting the number of normal (strong and weak), abnormal (deformed and decayed) and dead seedlings. For the initial growth test of the seedlings, it was evaluated the shoot length of seedlings, the radicle length of seedlings and the dry masses of shoot and rootlets. The average germination obtained did not present significant difference in any of the variables. For the length and dry mass of the aerial part and radicle obtained in the initial growth test of the seedlings, there was also no significant difference. The use of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, inoculated alone or in co-inoculation, did not interfere with germination and initial seedling growth of the tested soybean cultivar.

**Keywords:** growth-promoting bacteria; biological nitrogen fixation; Mixed inoculation; *Glycine max*.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, e o aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e à eficiência dos produtores. As expectativas para a temporada 2018/19 mantêm a tendência de crescimento da área plantada, atingindo 1,8% de crescimento em relação à safra passada, correspondendo ao plantio de 35.775,2 mil hectares (CONAB, 2019). Diversos fatores e manejos podem interferir na produtividade e na qualidade de sementes e, dentre eles, a nutrição de plantas vem sendo intensamente estudada.

Parte da nutrição da soja vem da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) proveniente de inoculação das sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, uma tecnologia já estabelecida e amplamente utilizada, cujas associações entre esse e outros gêneros de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) também têm sido estudadas, demonstrando resultados promissores.

Pelo exposto, outras tecnologias alternativas e sustentáveis vêm sendo pesquisadas, como, por exemplo, a coinoculação, que é uma tecnologia recente no Brasil e que pode trazer melhorias nos resultados produtivos para a cultura da soja. Ela combina uma prática já bem conhecida pelos produtores que consiste na inoculação de *Bradyrhizobium*, com o uso do *Azospirillum*, uma bactéria até então conhecida por sua ação promotora de crescimento em gramíneas (BÁRBARO et al., 2008; BÁRBARO et al., 2011; FERLINI, 2006; RUFINO, 2014). Essa técnica está em sintonia com a abordagem atual da agricultura, que respeita as demandas de altos rendimentos, todavia com sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental.

O *Azospirillum* possui, além da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, a capacidade de promover o aumento da atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas, e produção de hormônios como auxinas, citocininas, giberilinas e etileno (CASSÁN et al., 2009).

No entanto, alguns resultados obtidos por pesquisadores a partir de combinações de micro-organismos inoculantes em plantas leguminosas se mostraram contraditórios, podendo tanto estimular quanto inibir a formação de nódulos e crescimento de raízes, variando em função do nível de concentração do inóculo e forma de inoculação (BÁRBARO et al., 2008).

Avaliando a inoculação com *Bradyrhizobium* e coinoculação com *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* em sementes de soja associada à aplicação de 0, 75 e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N de ureia aplicada em cobertura no estágio reprodutivo, Fipke et al. (2016) observaram que a coinoculação proporcionou incremento de 240 kg ha<sup>-1</sup> de grãos em relação à inoculação convencional. Hungria et al. (2015) demonstraram que a coinoculação é eficiente e benéfica para a cultura; e promove aumentos de rendimento sem adicionar fertilizantes químicos nitrogenados, mesmo em solos onde existem populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* de soja.

Em suma, os estudos apontam que a coinoculação pode trazer bons retornos na produtividade da soja e no manejo da adubação nitrogenada, mas pouco se sabe sob o impacto na fase germinativa. Ao que tange o processo germinativo, as pesquisas com o uso do *Azospirillum* concentram-se nas espécies de gramíneas, todavia a resposta referente a utilização de coinoculação com *Bradyrhizobium* em soja vem gradativamente consolidando-se como tecnologia de grande interesse agrônomo.

Sabe-se que a resposta não é única, havendo interação entre cultivar e *Azospirillum* (LIBÓRIO et al., 2016) quanto ao desenvolvimento inicial da plântula. Embora estas bactérias possam inibir a germinação de sementes de *Glycine max* L. (MIHĂȘAN; ȘTEFAN, 2008), há trabalhos que indicam que ela pode ser usada juntamente com *Bradyrhizobium*, incluindo aqueles já estabilizados em solos (AUNG et al., 2013). Devido a esta incerteza, Mihășan e Ștefan (2008) sugerem a inoculação com *Azospirillum* após a germinação, ainda no estágio de plântula.

Frente à consolidação da técnica da coinoculação no agronegócio brasileiro e as respostas contraditórias e dependente da interação genética entre cultivar e isolado de *Azospirillum* ainda no estágio germinativo, o trabalho teve como objetivo avaliar a coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* no desempenho germinativo de sementes da cultivar de soja AS 3680 IPRO.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Análises de Sementes da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizada na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, no ano de 2016.

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (*B. japonicum*; *A. brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* e testemunha sem inoculação) e cinco repetições. As avaliações foram realizadas por meio do teste de germinação em rolo de papel e do teste de crescimento de plântulas. A cultivar de soja utilizada para o experimento foi AS 3680 IPRO, genótipo precoce, grupo de maturação 6,8, alta sanidade e potencial produtivo, bom engalhamento. É recomendada para a região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, além do sudoeste de Goiás e norte do Mato Grosso do Sul. Foram utilizadas as doses de 100 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes de soja de *A. brasilense* do produto Masterfix Gramíneas® L, cepas – AbV5 e AbV6 (2x10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>) e 100 mL ha<sup>-1</sup> de *B. japonicum* do produto Masterfix Soja® L, cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 (5x10<sup>9</sup> de células viáveis mL<sup>-1</sup>). Os inoculantes foram depositados em sacos plásticos, onde se acondicionou também as sementes e, posteriormente, realizada a agitação dos sacos plásticos por um minuto, atingindo cobertura homogênea sobre as sementes. Para facilitar a homogeneização, foi adicionado a todos os tratamentos 0,5 mL de água destilada, incluindo na testemunha. As sementes utilizadas não receberam tratamento com defensivos.

Para o teste de germinação, 50 sementes tratadas foram dispostas em uma folha de papel germitest umedecida com água destilada em quantidade duas vezes a do peso do papel e, em seguida, coberta com mais uma folha de papel germitest da mesma forma: umedecida e depois enroladas. Cada parcela foi constituída de 4 rolos, embrulhadas posteriormente em um único rolo, totalizando 200 sementes por parcela. Foram dispostas na posição vertical dentro do germinador com temperatura constante de 25 °C por oito dias, de acordo com as prescrições das Regras de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

As avaliações foram realizadas a partir do terceiro dia para determinação da porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas. As plântulas que desenvolveram todas as estruturas essenciais do embrião de forma proporcional foram classificadas como normais e, dentre elas, classificadas entre fortes e fracas de acordo com seu desenvolvimento. Já as plântulas que apresentaram alguma anomalia em seu desenvolvimento foram consideradas anormais e classificadas como deformadas (dano mecânico e/ou genético) e deterioradas (atacadas por algum patógeno). Além disso, as sementes que não apresentaram nenhum sinal de germinação foram consideradas mortas, segundo critérios das RAS (BRASIL, 2009).

Para o teste de crescimento de plântulas, 20 sementes tratadas foram dispostas na posição superior de uma folha de papel germitest, umedecida com água destilada, em quantidade duas vezes a do peso do papel, com os hilos voltados para baixo e, posteriormente, coberta com mais uma folha de papel germitest da mesma forma: umedecida e depois enroladas. Cada parcela foi constituída de quatro rolos, embrulhadas adiante em um único rolo, totalizando 80 sementes por parcela. Foram dispostas na posição vertical dentro do germinador com temperatura constante de 25 °C por sete dias, de acordo com as prescrições das RAS (BRASIL, 2009).

Ainda para o teste de crescimento de plântulas, procedeu-se a leitura do comprimento de radícula (CR), comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas normais, excluindo os cotilédones. Foi utilizada uma escala métrica em aço com resolução de 0,5 mm e a medição foi realizada no sétimo dia. A posteriori, parte aérea e radículas foram separadas, acondicionadas em sacos de papel e levadas para estufa com circulação de ar forçado a 65 °C até massa constante (NAKAGAWA, 1999) para avaliação de massa seca de parte aérea (MSPA) e radículas (MSR). Os valores foram obtidos por meio da pesagem das amostras secas em balança com resolução de 1 mg, e os resultados das médias expressos em gramas por plântula.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade, homogeneidade, aditividade e análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de germinação, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1), confirmando resultados observados por Cassán et al. (2009), cujos tratamentos não diferiram e sugerem que o efeito promotor em fase inicial de crescimento pode não depender de bactérias. Resultados semelhantes foram relatados por Silva et al. (2017) com sementes de amendoim que, independente da inoculação isolada ou combinada, não afetou significativamente a porcentagem de emergência, indicando que a inoculação de bactérias simbióticas e associativas nas sementes não comprometeu o estabelecimento inicial do estande de plantas.

Em contrapartida, contraria os resultados obtidos por Garcia (2015), em que a utilização do *A. brasilense* na dose 200 ml ha<sup>-1</sup> promoveu sementes com melhor germinação na primeira contagem proporcionalmente ao aumento da dose do *B.*

*japonicum*. Este efeito é motivado pela interação genética, como constatado por Libório et al. (2016) ao testar as variedades Brasmax Flecha IPRO, BMX Potência RR, 5D634RR e NS 7338 IPRO, ficando claro que, para a cultivar NS 7338 IPRO, a coinoculação promoveu o desenvolvimento e, para as demais, não houve diferença.

Em um estudo realizado por Bulegon et al. (2016), foi observado o efeito dos tratamentos inoculação e coinoculação com *A. brasilense* e *B. japonicum* em soja apenas para a cultivar Turbo, sendo que os maiores valores médios foram observados nas plantas inoculadas com *A. brasilense*, demonstrando diferença na capacidade de resposta entre cultivares. Para Lima et al. (2018) foram as doses mais altas de *A. brasilense* (200 e 250 ml kg<sup>-1</sup> de sementes) que beneficiaram a germinação, porém em sementes de algodão.

Para Bárbaro et al. (2011), os resultados obtidos com a coinoculação podem, no entanto, mostrar respostas contraditórias, ou seja, tanto estimular como inibir a formação de nódulos e o crescimento radicular em um sistema simbiótico, variando em função do nível de concentração do inóculo e do tipo e da forma de inoculação.

**TABELA 1.** Teste de germinação de sementes em função de inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Inoculantes <sup>1</sup> | Plântulas Normais (%) |        |       | Plântulas Anormais (%)  |              | Mortas (%) |
|--------------------------|-----------------------|--------|-------|-------------------------|--------------|------------|
|                          | Fortes                | Fracas | Total | Deformadas <sup>2</sup> | Deterioradas |            |
| Brad                     | 64,0a                 | 16,6a  | 80,6a | 4,9a                    | 8,5a         | 6,0a       |
| Azosp                    | 64,4a                 | 16,4a  | 80,8a | 4,9a                    | 7,9a         | 6,4a       |
| Brad+Azosp               | 68,3a                 | 15,5a  | 83,8a | 5,0a                    | 5,6a         | 5,6a       |
| Testemunha               | 61,1a                 | 20,0a  | 81,1a | 6,5a                    | 7,0a         | 5,4a       |
| CV (%)                   | 8,28                  | 18,78  | 4,19  | 35,04                   | 24,60        | 41,13      |
| DMS                      | 10,02                 | 6,04   | 6,42  | 3,52                    | 3,36         | 4,56       |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à significância de 0,05; <sup>2</sup>A variável plântulas deformadas incluem as plântulas danificadas.

As médias de comprimento de plântulas, parte aérea e radícula obtidas não apresentaram diferença (Tabela 2). Em contraposição a essa informação, Aung et al. (2013) verificaram aumento de massa de plântulas quando se utilizou a técnica de coinoculação em sementes de soja, independente da concentração de células vivas do micro-organismo presente no inoculante. Nesta mesma linha, porém trabalhando com outra bactéria, Santos et al. (2016) afirmaram haver potencial no isolado bacteriano UAGF76, endofítico de raiz, para a promoção de crescimento de plantas, testado em feijão caupi. Ferlini (2006) também observou potencial para promoção de crescimento de

plantas quando proporcionou coinoculação com bactérias diazotróficas, obtendo plantas com sistema radicular mais desenvolvido, enquanto no trabalho de Lima et al. (2018) o *Azospirillum* prejudicou o comprimento da parte aérea.

**TABELA 2.** Médias de crescimento de plântulas em função de inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Inoculantes <sup>1</sup> | CPA (cm) <sup>2</sup> | CR (cm) | MSPA (g) | MSR (g) |
|--------------------------|-----------------------|---------|----------|---------|
| Brad                     | 6,64a                 | 14,83a  | 0,030a   | 0,016a  |
| Azosp                    | 6,61a                 | 14,23a  | 0,030a   | 0,018a  |
| Brad+Azosp               | 6,71a                 | 14,28a  | 0,026a   | 0,017a  |
| Testemunha               | 6,19a                 | 14,38a  | 0,025a   | 0,017a  |
| CV (%)                   | 9,03                  | 6,90    | 19,770   | 11,690  |
| DMS                      | 1,11                  | 1,87    | 0,010    | 0,004   |

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à significância de 0,05; <sup>2</sup> Crescimento de parte aérea (CPA); Crescimento de raiz (CR); Massa seca de parte aérea (MSPA); Massa seca de radícula (MSR).

Para massa seca de parte aérea e radícula obtidos a partir do teste de crescimento de plântulas também não houve diferença (Tabela 2), confirmando os resultados para a massa seca de parte aérea de Bulegon et al. (2014), que não encontraram diferenças significativas para as cultivares avaliadas, mas observaram diferença em massa seca do sistema radicular, tanto entre as cultivares testadas quanto entre tratamentos com inoculação. Entretanto, Libório et al. (2016) demonstraram resultados contrários, em que a massa seca de parte área apresentou significância estatística, com superioridade da coinoculação (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) e não diferença significativa para massa seca de sistema radicular e para sementes de algodão, enquanto Lima et al. (2018) afirmaram que houve aumento para os parâmetros de raiz e matéria seca total.

Garcia (2015), estudando a cultivar TMG 4182, relatou incremento na massa seca de raízes com a aplicação de doses de *A. brasilense*, confirmando resultados de Dardanelli et al. (2008), que afirmaram que a presença do *A. brasilense*, tanto pela fixação de nitrogênio atmosférico quanto pela produção de fitohormônios, contribui para o incremento do sistema radicular devido ao aumento de radículas e/ou diâmetro das raízes.

Libório et al. (2016) verificaram comportamento diferenciado entre as cultivares de soja quando submetidas à inoculação e coinoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* para os parâmetros germinação, massa seca de raiz e parte aérea. Esta variação nos resultados encontrados, neste e em outros trabalhos, pode estar relacionada com a afinidade das bactérias do gênero *Azospirillum* com determinadas cultivares, conforme

relatos de Reis et al. (2000). Além disso, a não diferença entre os tratamentos pode ser interpretada como um resultado benéfico, uma vez que não afetou negativamente a germinação e o crescimento inicial das plântulas.

#### 4 CONCLUSÃO

O uso de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* inoculados isoladamente ou em coinoculação não interferem na germinação das sementes, vigor, crescimento de plântulas, massa seca de parte aérea e radícula. A coinoculação não prejudica o desenvolvimento inicial das plântulas.

#### REFERÊNCIAS

- AUNG, Thi Thi; Tittabutr, P.; Boonkerd, N.; Herridge, D.; Teaumroong, N. Co-inoculation effects of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum* sp. on competitive nodulation and rhizosphere eubacterial community structures of soybean under rhizobia-established soil conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, 2013. DOI: 10.5897/AJB12.2557. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/131269/120863>. Acesso em: 30 jan 2017.
- BÁRBARO, I. M.; BÁRBARO JÚNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MACHADO, P. C.; MIGUEL, F. B. Resultados preliminares da co-inoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2011/2011-julho-dezembro/853-resultados-preliminares-da-co-inoculacao-de-azospirillum-juntamente-com-bradyrhizobium-em-soja/file.html>. Acesso em: 22 jun de 2017.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. In: INFOBIBOS – Informações Tecnológicas. **INFOBIBOS**. Campinas: INFOBIBOS, 2008. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm). Acesso em: 14 set. 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BULEGON, L. G., L. RAMPIM, J. KLEIN, D. KESTRING, V. F. GUIMARÃES, A. G. BATTISTUS, E A. M. INAGAKI. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, Chapingo, v, 34, n. 2, p. 169-176, 2016. Disponível em:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v34n2/2395-8030-tl-34-02-00169.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2017.

BULEGON, L.G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V.F.; BATTISTUS, A.G.; KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n.1, p. 26-37, 2014. Disponível em: <http://www.dca.uem.br/V3N1/03-Lucas.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2016.

CASSÁN, F.; PERRIGA, P.; SGROYA, V.; MASCIARELLIA, O.; PENNAB, C.; LUNAA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combinati promote seed germination and early seedling gron corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 45, n. 5, p. 28–35, 2009. DOI:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556308001064>. Acesso em: 04 jul. 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos**. V. 6 - Safra 2018/19 n. 7 - Sétimo levantamento, p. 1-69. Brasília, 2019. Disponível em:

[https://www.conab.gov.br/.../safras/graos/...safra...graos/.../23999\\_57b97f236e2bf03f1f](https://www.conab.gov.br/.../safras/graos/...safra...graos/.../23999_57b97f236e2bf03f1f). Acesso em: 03 mar. 2019.

DARDANELLI, M. S.; CÓRDOBA, F.; ESPUNY, R.; CARVAJAL, M. A. R.; DIAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y. MEGIAS, M.; Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 11, p. 2713–2721. 2008. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.06.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071708002149>. Acesso em: 24 ago. 2018.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (Glicyne max) con Bradyrhizobium japonicum y Azospirillum brasilense**. Artículos Técnicos – Agricultura. 2006. Disponível em:

<[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glicyne\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glicyne_s_articulos_800_AGR.htm)>. Acessado: 25 ago. 2015.

FIPKE, G. M.; CONCEIÇÃO, G. M.; GRANDO, L. F. T.; LUDWIG, R. L.; NUNES, U. R.; MARTIN, T. N. Co-inoculation with diazotrophic bacteria in soybeans associated to urea topdressing. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 5, p. 522-533, Oct. 2016. DOI: 10.1590/1413-70542016405001316. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542016000500522&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542016000500522&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 04 jul. 2017.

GARCIA, A. **Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia. Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira. 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138390/000864065.pdf?sequence=1> Acesso em: 27 jun 2017.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/879471/inoculacao-com-azospirillum-brasilense-inovacao-em-rendimento-a-baixo-custo>. Acesso em: 20 abr. 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n. 1-2, p.413-425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 20 abr. 2015.

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. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/468512/a-importancia-do-processo-de-fixacao-biologica-do-nitrogenio-para-a-cultura-da-soja-componente-essencial-para-a-competitividade-do-produto-brasileiro>. Acesso em: 20 abr. 2015.

HUNGRIA, M., Nogueira, M.A. and Araujo, R.S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.66087. Disponível em: [http://file.scirp.org/Html/3-2601966\\_55340.htm](http://file.scirp.org/Html/3-2601966_55340.htm). Acesso em: 05 jul. 2016.

LIBÓRIO, P. H. da S.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; NÓBILE, F. O. de; MIGUEL, F. B.; SILVA, F. M. da. Interação entre cultivares, bactérias e micronutrientes na germinação e desenvolvimento inicial de soja. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 8, n. 1, 2016. Número especial 2. Disponível em: <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/1031/pdf>. Acesso em: 15 nov. 2016.

LIMA, S. F. de; SIMON, C. A.; LEITE, R. da C.; NOGUEIRA, K. B.; ALVAREZ, R. de C. F. Humic acid and *Azospirillum brasilense* applied to cotton seeds. **Brazilian Journal of Agriculture**. v.93, n.1, p. 1 – 11, 2018. Disponível em: <http://www.revistadeagricultura.org.br/index.php/revistadeagricultura/article/view/3228/pdf>. Acesso em: 14 abr. 2017.

MIHĂȘAN, M.; STEFAN, M. The evolution of total soluble proteins content during the germination of *Glycine max* L.L. beans under the influence of some rhizobacterial strains. **Lucrări Științifice**, v. 51, p. 7-13, seria Agronomie, 2008. Disponível em: [http://www.revagrois.ro/PDF/2008\\_2\\_7.pdf](http://www.revagrois.ro/PDF/2008_2_7.pdf). Acesso em: 06 out. 2017.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 19, n. 2, p. 227–247, 2000. DOI: 10.1080/07352680091139213. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680091139213>. Acesso em: 23 fev. 2016.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum***. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 20 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/629377/uso-de-bacterias-fixadoras-de-nitrogenio-como-inoculante-para-aplicacao-em-gramineas>. Acesso em: fev. 2017.

RUFINO, C. **Tecnologia de coinoculação combina alto rendimento com sustentabilidade na produção de soja e do feijoeiro**. EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1580416/tecnologia-de-coinoculacao-combina-alto-rendimento-com-sustentabilidade-na-producao-de-soja-e-do-feijoeiro>. Acesso em: 12 out. 2018.

SANTOS, I. B. dos; SILVA, F. G. da; VIANA, J. S.; SANTOS, C. G. G. dos; SILVA, J. A. T. da; SOBRAL, J.K. Desenvolvimento inicial de plântulas de feijão caupi: inoculação bacteriana x adubação mineral (npk). **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 8, 2016. Disponível em: <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/684/pdf>. Acesso em: jul. 2017.

SILVA, E. R. da; SALLES, J. S.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em sementes de amendoim de diferentes tamanhos. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 4, Suplemento 1, p. 93-102, dez. 2017. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/2192/1801>. Acesso em: 20 ago. 2017.

## CAPÍTULO 3

## RESUMO

BARROS, F. C. **Doses de *Azospirillum brasilense* via fertilizante organomineral coinoculado com *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja até o florescimento.**

No Brasil, a utilização de bactérias inoculantes em soja é uma prática amplamente utilizada, promovendo fixação biológica do nitrogênio, possibilitando uma economia expressiva em fertilizantes nitrogenados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do fertilizante organomineral como veículo de inoculação do *Azospirillum brasilense* e a influência da associação entre o *Bradyrhizobium japonicum* e *A. brasilense* no desenvolvimento da cultura da soja. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, em esquema fatorial  $4 \times 2 + 1$ , correspondentes à quatro doses de *A. brasilense* (0, 100, 200 e 300 mL  $50 \text{ kg}^{-1}$  de sementes de soja) do produto Masterfix Gramíneas® L, cepas – AbV5 e AbV6 ( $2 \times 10^8$  células viáveis  $\text{mL}^{-1}$ ), com e sem inoculação de *B. japonicum* na dose de 100 mL  $\text{ha}^{-1}$  do produto Masterfix Soja® L, cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 ( $5 \times 10^9$  de células viáveis  $\text{mL}^{-1}$ ), e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos. A parcela experimental foi constituída por dois vasos plásticos de 5 L e conduzido na casa de vegetação da Fazenda Capim Branco – UFU. Foi utilizada a cultivar AS 3680 IPRO. Foram realizadas avaliações fenométricas, clorofilas A e B e análises químicas. A inoculação isolada com *A. brasilense* proporciona incrementos na área foliar das plantas de soja cultivar AS 3680 IPRO. O método de inoculação de *A. brasilense* via fertilizante organomineral demonstra eficiência.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio; Inoculação mista; *Glycine max*; Bactérias promotoras de crescimento.

## ABSTRACT

BARROS, F. C. **Doses of *Azospirillum brasilense* via organomineral fertilizer co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* in soybean crop until flowering.**

The use of inoculant bacteria in soybean is a practice widely used in Brazil, promoting biological fixation of nitrogen and, thus, making possible an expressive saving of nitrogen fertilizers. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the organomineral fertilizer as a vehicle of inoculation of *Azospirillum brasilense* and the influence of the association between *Bradyrhizobium japonicum* and *A. brasilense* on the development of soybean crop. The experiment was conducted in a randomized block design with four replicates, in a  $4 \times 2 + 1$  factorial scheme, corresponding to four doses of *A. brasilense* (0, 100, 200 and 300 mL  $50 \text{ kg}^{-1}$  of soybean seeds) of the product Masterfix Gramíneas® L, AbV5 and AbV6 strains ( $2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  viable cells), with and without inoculation of *B. japonicum* at 100 mL  $\text{ha}^{-1}$  of Masterfix Soja® L, SEMIA 5019 and SEMIA 5079 strains ( $5 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$  viable cells) and an additional treatment corresponding to the control (without inoculants and without fertilizer), totaling nine treatments. The experimental plot consisted of two plastic pots of 5 L and it was conducted in the greenhouse of Fazenda Capim Branco - UFU. The cultivar AS 3680 IPRO was used. Phenometric, chlorophyll A and B evaluations and chemical analyzes were performed. The isolated inoculation with *A. brasilense* provides increases in the leaf area of AS 3680 IPRO soybean cultivars. The inoculation method of *A. brasilense* via organomineral fertilizer demonstrates efficiency.

**Keywords:** Biological fixation of nitrogen; Mixed inoculation; Glycine max; Growth promoting bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

Para a cultura da soja, assim como na agricultura de forma geral, os parâmetros de maior importância são a produtividade, eficiência e a lucratividade, mas é sempre muito importante pensar nessas características juntamente com o conceito de sustentabilidade aplicado a todo o processo.

Um fator de grande importância na cultura da soja é a inoculação, visando fornecimento de N via fixação biológica de nitrogênio, uma prática que apresenta atuação positiva na vertente econômica e ambiental. A relação estabelecida entre soja e bactérias envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio é dependente da seleção de estirpes e da resposta em relação a cultivar utilizada e, por consequência, externa o potencial produtivo gerando retorno econômico (BÁRBARO-TORNELI et al., 2018).

A inoculação das sementes de soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* fornece, praticamente, todo o nitrogênio que a planta necessita para expressar seu potencial produtivo sem ocasionar perdas de N ao ambiente (TAIZ; ZAIGER, 2013). Afim de aumentar a eficiência do fornecimento de N para as plantas na cultura da soja, uma técnica alternativa tem sido empregada, a coinoculação, utilização de combinações de diferentes micro-organismos (como, por exemplo, *B. japonicum* e *A. brasilense*) com efeito sinérgico (BÁRBARO et al., 2008; FERLINI, 2006;).

As bactérias do gênero *Azospirillum* atuam na síntese de fitormônios vegetais que promovem o desenvolvimento da planta, favorecendo uma melhor exploração do solo e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes, aumentando sua resistência a estresses bióticos e abióticos (SINGH et al., 2013) e, também, atuam como agentes de controle biológico por induzirem resistência sistêmica na planta (BASHAN et al., 2014).

Dentro da cadeia produtiva, os fertilizantes demonstram grande importância e representam considerável parte do custo de produção de uma lavoura. Como uma alternativa mais sustentável à utilização de fertilizantes minerais, tem-se o fertilizante organomineral, que alia matéria orgânica a nutrientes de origem mineral, segundo o Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004) e Instrução Normativa Nº 23, de 31 de agosto de 2005, da legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Para elaboração deste tipo de fertilizante pode ser utilizado diversas matérias-primas, entre elas o lodo de esgoto (ABISOLO, 2010; RAMOS et al., 2017), que é um

resíduo rico em material orgânico e nutrientes, gerado durante o tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgotos. Este resíduo constitui sérios problemas ambientais e exigem áreas cada vez maiores para descarte (RIGO et al., 2014).

O fertilizante organomineral apresenta potencial químico reativo relativamente inferior ao fertilizante mineral, porém sua solubilização é gradativa ao longo do tempo durante o desenvolvimento da cultura, o que melhora sua eficiência agrônômica comparando às fontes minerais solúveis (KIEHL, 2008) aumentando, assim, a interação planta-nutriente por reduzir a adsorção de íons, em especial o íon fósforo. (PARENT et al., 2003). Em consequência, ocorre a diminuição da transformação de  $P_2O_5$  em formas indisponíveis para a planta (KHIARI; PARENT, 2005).

Existe um interesse por parte da indústria do organomineral em desenvolver produtos que contenham substâncias que promovam o controle fitossanitário, nanotecnologia, fertilizantes com aminoácidos e incorporação da biotecnologia nos processos produtivos de insumos agrícolas, tais como microrganismos solubilizadores de fontes de fósforo. Sendo que estes são fornecidos, principalmente, na forma granulada, farelada e peletizada (GAZIRE, 2016).

Devido às suas características, o fertilizante organomineral se apresenta como uma possibilidade para novas técnicas de inoculação e coinoculação, atuando como veículo para o fornecimento de microrganismos. Com isso, novas técnicas precisam ser desenvolvidas ou aprimoradas, visando facilitar à aplicação do produto (BÁRBARO-TORNELI et al., 2017; FONSECA, 2011).

Pelo fato da expansão da produtividade estar intimamente ligada ao desenvolvimento de tecnologias aplicáveis que viabilizam a eficiência competitiva da soja, objetivou-se com este trabalho verificar a eficiência da inoculação de *Azospirillum brasilense*, via fertilizante organomineral, de forma isolada ou em adição à inoculação tradicional de *Bradyrhizobium japonicum* para o desenvolvimento da cultura da soja.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em casa de vegetação do tipo cobertura alta na Fazenda Capim Branco, da Universidade Federal de Uberlândia, localizada no município de Uberlândia-MG, cujas coordenadas geográficas são 18° 52' S; 48° 20' W e 872 m de altitude, no ano de 2017.

A cultura utilizada foi a soja, cultivar AS 3680 IPRO, genótipo precoce, grupo de maturação 6,8, alta sanidade e potencial produtivo, bom engalhamento. É recomendada para a região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, além do sudoeste de Goiás e norte do Mato Grosso do Sul.

Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 4×2 +1, correspondentes à quatro doses de *A. brasilense* (cepas – AbV5 e AbV6) de um produto comercial (0, 100, 200 e 300 mL 50 kg<sup>-1</sup> sementes de soja), com e sem inoculação de *B. japonicum* (cepas SEMIA 5019 e SEMIA 5079) de um produto comercial na dose 100 mL há<sup>-1</sup> e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos (Tabela 3) e 36 parcelas.

**TABELA 3.** Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.

| Dose de <i>A. brasilense</i>                    | <i>B. Japonicum</i> |
|---|---------------------|
| 0   | Sim                 |
| 0   | Não                 |
| 100 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 100 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| 200 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 200 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| 300 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 300 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| Testemunha – sem inoculantes e sem fertilizante |                     |

Todas as plantas, com exceção à testemunha, foram fertilizadas com fertilizante organomineral peletizado. O bio-sólido utilizado como parte orgânica do fertilizante foi proveniente do lodo de esgoto da estação de tratamento do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Uberlândia (DMAE), localizada no município de Uberlândia, MG. O lodo de esgoto foi higienizado segundo metodologia utilizada por Alves Filho (2016), visando à eliminação dos patógenos e a redução da umidade; e inserida como parte orgânica do adubo pela empresa Geociclo na formulação 3-17-10 com B (0,2 %), Zn (0,3%) e Mn (0,3%).

O fertilizante passou pelo processo de inoculação do *A. brasilense*, realizado a semelhança de um tratamento de sementes: *pellets* do fertilizante colocados em sacos

plásticos contendo as doses de inoculante, adicionado 0,5 mL de água para facilitar a distribuição do inoculante e agitados para homogeneização, para posterior aplicação no solo. Já a inoculação de *B. japonicum* foi realizada da forma usual, sobre a semente.

## 2.1 Condução

O solo utilizado foi coletado na Fazenda Capim Branco e classificado como Latossolo Vermelho Distrófico de acordo com Santos et al. (2018). Após a homogeneização, secagem e peneiramento, foram retiradas amostras para análise química do solo (Tabela 4).

**TABELA 4.** Caracterização química da amostra do solo coletado. Uberlândia, 2017.

| pH água<br>1-2,5 | P <sub>meh-1</sub>       | K <sup>+</sup>                                | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup>               | Al <sup>3+</sup> | H+Al | SB   | t    | T    |  |
|------------------|--------------------------|---|------------------|--------------------------------|------------------|------|------|------|------|--|
|                  | --mg dm <sup>-3</sup> -- | -----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ----- |                  |                                |                  |      |      |      |      |  |
| 6,0              | 8,3                      | 0,26  | 2,0              | 0,6                            | 0,0              | 1,50 | 2,86 | 2,86 | 4,36 |  |
| V                | M                        | M.O. C.O.                                     |                  | B                              |                  | Cu   | Fe   | Mn   | Zn   |  |
| ----- % -----    |                          | -----dag kg <sup>-1</sup> -----               |                  | -----mg dm <sup>-3</sup> ----- |                  |      |      |      |      |  |
| 66               | 0                        | 2,3   | 1,3              | 0,07                           | 7,8              | 10,0 | 5,7  | 0,9  |      |  |

P, K=(HCL 0.05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0125 mol L<sup>-1</sup>) P disponível (extrator Mehlich<sup>-1</sup>); Ca, Mg, Al (KCl 1 mol L<sup>-1</sup>); H+Al= (Solução Tampão SMP a pH 7.5); SB= Soma de Bases; t= CTC efetiva; T= CTC a pH 7.0; V= Saturação por bases; m= Saturação por Alumínio (EMBRAPA, 1997), M.O = Método Colorimétrico. B = (BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.0125% à quente); Cu, Fe, Mn, Zn= (DTPA 0.005 mol L<sup>-1</sup> + TEA 0.1 mol L<sup>-1</sup> + CaCl<sub>2</sub> 0.01 mol L<sup>-1</sup> a pH 7.3).

A dose do fertilizante organomineral foi definida tendo como referência o teor de P do solo e seguindo a “Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais” (CFSEMG, 1999), o que correspondeu a 80 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

A semeadura foi realizada no dia 05 de janeiro de 2017, na profundidade de três centímetros, em vasos com aproximadamente 5 litros, sendo colocadas oito sementes por vaso, dispostas de forma circular. No centro, foi colocado o fertilizante a 4 cm de profundidade (Figura 1 A). Após 15 dias da semeadura, foram realizados os desbastes visando deixar duas plantas por vaso, cada parcela foi composta por dois vasos (Figura 1 B). O experimento foi conduzido até o estádio R2.



**FIGURA 1.** A) Disposição das sementes de soja, Cultivar AS3681IPRO e do fertilizante organomineral na semeadura. B) Vista geral do experimento, indicando vasos com duas plantas após o desbaste. Uberlândia – MG, 2019.

## 2.2 Avaliações

### 2.2.1 Análises Fenométricas

Para a medição da altura das plantas, foi utilizada uma fita métrica de resolução igual a 1,0 mm, medindo quatro plantas por parcela, nos estádios V6 e R2. A área foliar das plantas foi medida com a utilização de um escâner de folhas do fabricante LI-COR, modelo LI-3100C, resolução 0,1 mm<sup>2</sup>, sendo escaneadas todas as folhas de quatro plantas por parcela no estágio R2 (Figura 2).



**FIGURA 2.** Escaneamento de folhas para obtenção de área foliar (LI-COR, modelo LI-3100C). Uberlândia – MG, 2019.

A determinação de massa seca de parte aérea (MSPA) foi realizada ao final do experimento (R2), com quatro plantas por unidade experimental, que foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas para secagem, utilizando o método de secagem em estufa com circulação de ar forçada e com temperatura de 65°C até massa constante para posterior pesagem.

### **2.2.2 Teor de Clorofila**

Os teores de clorofila A e B foram medidos com a utilização de um clorofilômetro, fabricante ClorofiLog, modelo CFL 1030 Falker com resolução 0,1 Índice de Clorofila Falker (ICF). Foram medidos o teor de clorofila de quatro plantas por parcela, no estádio V6. As leituras de clorofila foram realizadas na folha média do terceiro trifólio completamente desenvolvido, no limbo foliar, evitando-se as nervuras das folhas.

### **2.2.3 Análise química**

Após a determinação da MSPA, as plantas foram moídas para realização da análise química foliar. Foram realizadas digestões úmidas (N - método Kjeldahl; P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn – método Nitro-perclórico) e secas (B – incineração em mufla).

O N, após digestão, passou pela destilação e posterior titulação. A análise de P foi feita correspondendo à determinação com molibdato-vanadato de amônio de reação amarela; para leitura utilizou-se o espectrofotômetro. Com este mesmo equipamento, procedeu-se as leituras para S e B. A leitura do K foi realizada com a utilização do fotômetro de chama. Para os elementos Ca, Mg, Fe, Mn, Cu e Zn, utilizou-se o princípio da determinação dos elementos químicos via espectroscopia de absorção atômica com chama.

Para a realização da análise de todos os elementos mencionados, seguiu-se a metodologia descrita pela Embrapa (SILVA, 2009).

### **2.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram inicialmente testados quanto às pressuposições de normalidade de resíduos (teste de Shapiro-Wilk), homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e aditividade de bloco (Teste de Tukey para aditividade), a 0,01 de significância, utilizando o programa SPSS versão 20.0.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) realizada pelo teste F, a 5% de probabilidade, comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância pelo software Assistat 7.7. Para as doses de *A. brasilense*, foram realizadas as regressões linear e quadrática, cujos ajustes das equações foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão a 5% de probabilidade pelo teste F e no maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com o auxílio do software Sisvar 5.6.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Altura de Plantas

Nos estádios fenológicos V6 e R2, as maiores médias, para altura de plantas, foram observadas nas plantas sem *B. japonicum*. Em comparação com a testemunha, somente a média referente à dose de 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes e sem *B. japonicum* não apresentou diferença significativa (Tabela 5).

Em trabalho sobre inoculação e coinoculação na cultura da soja, Gitti (2016) não encontrou diferença entre inoculação, coinoculação e aplicação de ureia em cobertura para a variável altura de plantas.

Em trabalho sobre coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* via sementes de soja realizado por Mundim et al (2018), a altura de plantas no final do ciclo apresentou média superior quando inoculada com a maior dose de *Bradyrhizobium* (3,0 x 10<sup>6</sup> células viáveis por semente) com relação à dose 0. Maurício Filho et al (2018) testando o desempenho agrônomico e a produtividade da cultura da soja com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* obtiveram os mesmos resultados para todos os tratamentos na variável altura de plantas.

Embora as bactérias do gênero *Azospirillum* realizem a FBN e possam produzir compostos promotores de crescimento ou estimular a produção endógena da planta desses compostos (RODRIGUES et al., 2012), este fato não foi observado no presente estudo.

**TABELA 5.** Altura média de plantas de soja (estádios V6 e R2) submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Altura V6 (cm)             |         | Altura R2 (cm)             |         |
|--|----------------------------|---------|----------------------------|---------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     |
| 0  | 26,15 *                    | 25,35*  | 30,03*                     | 30,13*  |
| 100  | 25,72 *                    | 27,85*  | 29,85*                     | 32,75*  |
| 200  | 25,15*                     | 27,9*   | 29,23*                     | 33,58*  |
| 300  | 22,23                      | 27,6*   | 26,45                      | 33,08*  |
| Média  | 24,79 B                    | 27,18 A | 28,89 B                    | 32,38 A |
| dicional   | 20,38                      |         | 23,4                       |         |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>0,945; 0,966; 0,101</b> |         | <b>1,714; 0,978; 0,054</b> |         |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade;

<sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

### 3.3 Massa Seca de Parte Aérea (MSPA)

A massa seca de parte aérea não apresentou diferença entre os fatores estudados, nem mesmo quanto a testemunha (Tabela 6). Os resultados observados são semelhantes aos relatados por Zuffo et al. (2015; 2016), em que a aplicação de *A. brasilense* e *B. japonicum* não apresentou efeito significativo.

Quando analisado o efeito das inoculações sobre a cultura da soja em estágio V4, Fachinelli (2018) verificou que a massa seca de folha, massa seca de haste, teor de massa seca de folhas e o teor de massa seca de haste não diferiram estatisticamente para a inoculação e coinoculação, concluindo que as variáveis analisadas neste estágio fenológico não são influenciadas pelas combinações de inoculação e coinoculação testados.

**TABELA 6.** Massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | MSPA (g)              |        |
|--|-----------------------|--------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i> |        |
|  | Com                   | Sem    |
| 0  | 3,29                  | 2,83   |
| 100  | 2,83                  | 3,12   |
| 200  | 2,82                  | 3,92   |
| 300  | 2,02                  | 3,74   |
| Média  | 2,74 A                | 3,40 A |
| Testemunha   | 1,35                  |        |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | 1,921; 0,949; 0,073   |        |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Bárbaro et al. (2009); Giti (2016) e Pavanelli e Araújo (2009) também concluíram que a massa seca das plantas não sofreu influência da inoculação ou coinoculação de *A. brasilense* e *B. japonicum*. Este último ainda afirma que, geralmente, a inoculação demonstra maiores diferenças em solos em que as populações de *Bradyrhizobium* são ausentes.

### 3.4 Área foliar (AF)

A área foliar das plantas apresentou melhores resultados quando tratadas com *A. brasilense*, independente da dose, e sem *B. japonicum*, em relação a testemunha (Tabela 7). A eficiência do *A. brasilense* fica mais evidente quando observa-se os resultados das plantas tratadas somente com *B. japonicum* e das plantas que não receberam nenhuma inoculação, porém foram fertilizadas. Esta comparação permite demonstrar que não houve interferência do fertilizante no aumento da área foliar das plantas e somente o *A. brasilense* foi responsável pela superioridade de resultados.

Em trabalho com soja associada à inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* após cultivos de outono-inverno, Flauzino et al. (2018) observaram que a maior média de índice de área foliar ocorreu na soja sem a presença de inoculante em sucessão ao milho solteiro. Em contrapartida, Maurício Filho et al. (2018) encontraram superioridade no tratamento com 10 doses de inoculante (200g *Bradyrhizobium japonicum* + 800 mL *Bradyrhizobium elkanii* 50 kg<sup>-1</sup> sementes) + 2 doses de *A. brasilense* (200 mL ha<sup>-1</sup>) para área foliar com relação aos demais tratamentos, apresentando um aumento de aproximadamente 80% em relação à Testemunha.

**TABELA 7.** Médias de área foliar de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

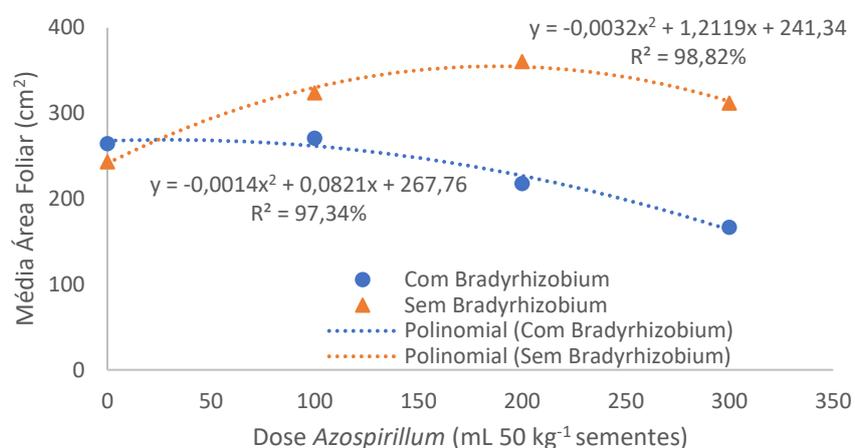
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Média AF (cm <sup>2</sup> ) |          |
|--|-----------------------------|----------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>       |          |
|  | Com                         | Sem      |
| 0  | 264,7                       | 243,4    |
| 100  | 270,83                      | 324,03*  |
| 200  | 217,75                      | 360,60*  |
| 300  | 166,63                      | 311,93*  |
| Média  | 229,98 B                    | 309,99 A |
| Testemunha   | 129,43                      |          |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | 4,523; 0,949; 0,443         |          |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Freitas e Souza (2017) verificaram que o tratamento com 6 doses de inoculante (200 g<sup>-1</sup> *Bradyrhizobium japonicum* + 400 mL<sup>-1</sup> *Bradyrhizobium elkanii* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes) com 2.227,715 cm<sup>2</sup> foi superior a todos os demais tratamentos. Drews (2016) em seu trabalho também relatou diferença para esta variável, em que a inoculação

mista (*B. japonicum* + *A. brasilense*) apresentou resultados superiores ao tratamento controle sem *A. brasilense* para os cultivares M 8372 IPRO e M 7739 IPRO.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau para área foliar das plantas. A equação demonstra que as maiores áreas foliares (356,08 e 268,96 cm<sup>2</sup>) foram alcançadas com as doses 189,36 e 29,32 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, sem e com a inoculação de *B. japonicum*, respectivamente. Doses superiores a essas promoveram decréscimo nas médias de áreas foliares (Figura 3).



**FIGURA 3.** Média da área foliar de plantas de soja na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.5 Teor de Clorofila

Os teores de clorofila A e B das plantas não apresentaram diferença significativa quanto a testemunha (Tabela 8).

Segundo Von Elbe (2000), as clorofilas A e B encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente. Contudo, essa proporção varia com a espécie, etapa do ciclo da planta, condições de crescimento e fatores ambientais (TAIZ; ZIEGER, 2004). Os dados coletados demonstram que a proporção entre as clorofilas no estágio V6 está em aproximadamente 4:1.

Segundo Bulegon (2019), o uso de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) atua nos pigmentos de duas formas: estimulando a síntese de clorofilas ou protegendo as clorofilas da degradação, estando altamente correlacionado à preservação dos teores de carotenoides, o que torna a planta mais tolerante à seca, bem

como acelera sua recuperação após o alívio do estresse. Em seu trabalho sobre *Azospirillum brasilense* na atividade enzimática de soja submetida à déficit hídrico, este autor conclui que o uso da inoculação foliar de *A. brasilense* auxilia na manutenção dos pigmentos fotossintéticos em folhas de soja após a ocorrência da deficiência hídrica.

**TABELA 8.** Média do teor de clorofila A e B (ICF) de plantas de soja no estágio V6, no experimento 1, submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Clorofila A - V6           |         | Clorofila B -V6            |        |
|--|----------------------------|---------|----------------------------|--------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                        | Sem     | Com                        | Sem    |
| 0  | 31                         | 31,55   | 7,58                       | 7,85   |
| 100  | 29,55                      | 29,6    | 7,25                       | 7,1    |
| 200  | 30,85                      | 29,15   | 7,95                       | 7,05   |
| 300  | 31,4                       | 29,55   | 8,1                        | 7,4    |
| <b>Média</b>   | 30,70 A                    | 29,96 A | 7,72 A                     | 7,35 A |
| <b>Testemunha</b>  | 30,13                      |         | 7,6                        |        |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>1,323; 0,979; 0,080</b> |         | <b>1,051; 0,982; 4,645</b> |        |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Todavia, essa relação entre BPCP e aumento de teor de clorofila não foram observados neste trabalho, assim como Schneider et al. (2017) também não observaram diferença significativa nos teores de clorofila cujas análises foram realizadas nos estádios V5 e R2. Em estudo realizado por Zuffo et al. (2016) e Zuffo et al. (2015), esta variável também não se mostrou responsiva aos tratamentos de inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

### 3.6 Análise Química

Por meio da análise química foliar realizada ao final da condução do experimento (R2), pode-se observar que os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre eles. Em comparação com a testemunha, os tratamentos com *B. japonicum* apresentaram menores teores de magnésio (Mg) e, nos demais tratamentos, para todos os outros nutrientes, não houve diferença (Tabela 9).

A análise química foliar feita em estágio R2 está de acordo com o recomendado pela EMBRAPA (1996) para avaliação do estado nutricional pela técnica da diagnose foliar, com o diferencial de ter sido realizada a análise de toda a parte aérea da planta.

Dessa forma, comparando os valores encontrados aos relatados por Vitti e Luz (1998), realizados também de acordo com a técnica da diagnose foliar, pode-se afirmar que apenas os teores de nitrogênio (N), potássio (K) e enxofre (S) estão abaixo dos valores normalmente encontrados em lavouras com alta produtividade.

Uma série de fatores no sistema solo-planta influencia na disponibilidade de nutrientes minerais devido, principalmente, às diferentes interações iônicas que podem ocorrer entre os elementos. Sabe-se que altos teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no solo causam inibição competitiva com o potássio (K), pois disputam o mesmo canal de absorção, diminuindo a absorção dos elementos que estiverem em menor concentração na solução do solo (MOREIRA et al., 1999), podendo ser esta a razão dos baixos teores de K na parte aérea.

O S encontra-se em sua maior parte associada ao N, na composição das proteínas, participando da formação de alguns aminoácidos importantes para o metabolismo energético. As assimilações de N e S em caso de deficiência de um deles pode reprimir a via assimilatória do outro (MALAVOLTA, 2005).

**TABELA 9.** Análise química de parte aérea de plantas de soja, submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| <sup>1</sup> Tratamentos | Macronutrientes    |      |       |       |       |      | Micronutrientes     |       |         |       |       |
|--------------------------|--------------------|------|-------|-------|-------|------|---------------------|-------|---------|-------|-------|
|                          | N                  | P    | K     | Ca    | Mg    | S    | B                   | Cu    | Fe      | Mn    | Zn    |
|                          | g kg <sup>-1</sup> |      |       |       |       |      | mg kg <sup>-1</sup> |       |         |       |       |
| <b>T1</b>                | 25,20              | 1,98 | 10,63 | 21,13 | 4,1*  | 1,53 | 70,61               | 9,33  | 772,48  | 50,60 | 33,23 |
| <b>T2</b>                | 24,50              | 1,75 | 10,88 | 22,45 | 4,15* | 1,63 | 55,49               | 8,80  | 935,58  | 53,95 | 31,14 |
| <b>T3</b>                | 25,38              | 2,10 | 11,00 | 21,98 | 4,13* | 1,48 | 48,61               | 10,13 | 2225,53 | 80,40 | 31,39 |
| <b>T4</b>                | 24,32              | 2,10 | 10,88 | 22,25 | 4,53* | 1,65 | 60,5                | 9,53  | 1423,23 | 63,13 | 26,23 |
| <b>T5</b>                | 23,98              | 1,95 | 10,75 | 21,52 | 4,80  | 1,63 | 68,48               | 9,73  | 724,85  | 46,58 | 28,35 |
| <b>T6</b>                | 20,48              | 2,18 | 11,50 | 21,8  | 5,03  | 1,73 | 70,09               | 9,80  | 1065,78 | 59,33 | 32,96 |
| <b>T7</b>                | 22,93              | 1,68 | 10,13 | 21,55 | 4,70  | 1,40 | 84,62               | 9,30  | 1633,58 | 67,13 | 32,74 |
| <b>T8</b>                | 24,85              | 2,25 | 10,50 | 22,13 | 4,85  | 1,88 | 75,4                | 9,45  | 951,58  | 58,60 | 30,53 |
| <b>Testemunha</b>        | 22,93              | 1,8  | 10,5  | 19,95 | 5,85  | 1,65 | 59,3                | 9,75  | 974,7   | 50,98 | 30,88 |

<sup>1</sup>T1 - Com *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T2 - Com *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T3 - Com *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T4 - Com *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*; T5 - Sem *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T6 - Sem *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T7 - Sem *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T8 - Sem *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*.<sup>2</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna (referente a *B. japonicum*) diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade.

Araújo Júnior (2018) também não observou interação significativa entre os tratamentos de inoculação da soja em nenhuma das avaliações realizadas relacionadas aos

teores foliares de macronutrientes. Segundo Drews (2016), em uma determinação de concentração de N foliar realizada em pleno florescimento, a inoculação mista de *B. japonicum* e *A. brasilense* não proporcionou maior acúmulo de N nas folhas comparado à inoculação apenas com *B. japonicum*. Nonato (2016) afirma que a inoculação de *A. brasilense* e o uso de reguladores vegetais promoveram melhorias nos teores de nutrientes foliares em seu experimento com a cultura da soja.

No entanto, quando relacionamos os nutrientes com a massa seca de parte aérea, obtendo valores totais médios dos nutrientes por plantas, observamos algumas diferenças, principalmente nas plantas tratadas com 200 e 300 mL de *A. brasilense* 50 Kg<sup>-1</sup> sementes sem *B. japonicum*, quando comparados a testemunha (Tabela 10). Este resultado demonstra que essas plantas acumularam mais nutrientes em sua parte aérea quando tratadas com as doses mais elevadas de *A. brasilense*.

**TABELA 10.** Análise química relacionada a massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| <sup>1</sup> Tratamentos | Macronutrientes             |        |        |        |        |        | Micronutrientes              |        |       |        |        |
|--------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------------|--------|-------|--------|--------|
|                          | N                           | P      | K      | Ca     | Mg     | S      | B                            | Cu     | Fe    | Mn     | Zn     |
|                          | (g totais média por planta) |        |        |        |        |        | (mg totais média por planta) |        |       |        |        |
| T1                       | 0,083*                      | 0,007  | 0,035* | 0,070* | 0,014  | 0,005  | 0,232                        | 0,030* | 2,571 | 0,170  | 0,112  |
| T2                       | 0,071                       | 0,005  | 0,031  | 0,065  | 0,011  | 0,005  | 0,142                        | 0,024  | 2,912 | 0,163  | 0,092  |
| T3                       | 0,072                       | 0,006  | 0,031  | 0,062  | 0,012  | 0,004  | 0,139                        | 0,028  | 5,857 | 0,219  | 0,090  |
| T4                       | 0,049                       | 0,004  | 0,021  | 0,045  | 0,009  | 0,003  | 0,109                        | 0,019  | 2,644 | 0,125  | 0,050  |
| T5                       | 0,068                       | 0,005  | 0,030  | 0,062  | 0,013  | 0,005  | 0,165                        | 0,027  | 2,105 | 0,135  | 0,080  |
| T6                       | 0,063                       | 0,007  | 0,036* | 0,067  | 0,015  | 0,005  | 0,206                        | 0,029* | 3,077 | 0,178  | 0,105  |
| T7                       | 0,10*                       | 0,007  | 0,04*  | 0,085* | 0,019* | 0,005  | 0,334*                       | 0,037* | 6,624 | 0,266* | 0,128* |
| T8                       | 0,095*                      | 0,009* | 0,039  | 0,082* | 0,018* | 0,008* | 0,261                        | 0,035* | 4,068 | 0,241  | 0,123* |
| <b>Testemunha</b>        | 0,031                       | 0,002  | 0,014  | 0,027  | 0,008  | 0,002  | 0,089                        | 0,013  | 1,366 | 0,070  | 0,042  |

<sup>1</sup>T1 - Com *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T2 - Com *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T3 - Com *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T4 - Com *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*; T5 - Sem *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T6 - Sem *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T7 - Sem *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T8 - Sem *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*.<sup>2</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna (referente a *B. japonicum*) diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade.

Schneider et al. (2017), ao avaliar doses de *Azospirillum* inoculado de forma isolada ou associado com *Bradyrhizobium* para a coinoculação, verificaram que o acúmulo de N em tecido foliar das plantas de soja varia de acordo com as combinações das doses de inoculantes em estágio V5. Entretanto, em R2, o teor de N no tecido foliar

das plantas foi estaticamente igual para todas as combinações de inoculação avaliadas. Fato este explicado em razão do estágio R2 marcar um período de elevado acúmulo de matéria seca e nutrientes pela planta para, posteriormente, translocar parte dos nutrientes para as flores e, depois, para vagens e sementes, diminuindo assim o teor de nutrientes nas folhas (FAGAN et al. 2007).

Fachinelli (2018) não observou diferença estatística para N, K, Ca e S em função dos tratamentos de inoculação nas sementes quando realizou análise química foliar em plantas de soja no estágio R1. Assim como Bulegon et al. (2015), que, ao trabalharem com duas variedades de soja sob efeito de adubação nitrogenada, inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, verificaram que, em estágio vegetativo R1, não ocorreu diferença estatística quanto ao acúmulo de N na parte aérea das plantas de soja.

De modo geral, os resultados com relação à coinoculação em soja têm se mostrado inconclusivos, podendo apresentar resultados contraditórios, estimulando ou inibindo a produção de nódulos e o crescimento das raízes em um sistema simbiótico, em função do nível de concentração do inóculo e do tipo de inoculação (FERLINI, 2006).

Confirmando os resultados encontrados no presente trabalho, pode-se citar Araújo Júnior (2018), que afirmou, em seu trabalho, que a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* nas sementes de soja não incrementaram os teores nutricionais foliares, crescimento, componentes da produção e produtividade, independentemente se em área de sequeiro ou irrigada.

A resposta dos cultivares também tem se mostrado diferente. Segundo Reis et al. (2000), existem variações relacionadas à afinidade das bactérias do gênero *Azospirillum* com determinadas cultivares. Tal fato é confirmado pelos resultados de Galindo et al. (2018), em que as cultivares "Potência" e "Valiosa" apresentaram incrementos de 25,7 e 10,2% no número de vagens; e de 5,7 e 1,6% em peso de 100 sementes, respectivamente, quando coinoculadas com *A. brasilense*.

Bulegon et al. (2016) também afirmam ter encontrado capacidade de resposta diferente entre os cultivares de soja BMX Turbo e Coodetec 250. Foi observado efeito dos tratamentos apenas para a cultivar Turbo, onde a testemunha apresentou menores médias e os maiores valores médios nas plantas inoculadas com *A. brasilense*.

Vale ressaltar também que os resultados podem mascarar os efeitos de tratamentos utilizados em ensaios conduzidos em casa de vegetação quando realizados em vasos. Tal fato pode ocorrer por causa das diferenças no grau de exploração das raízes das plantas confinadas no vaso em comparação à cultura no campo (COPE; EVANS, 1985), informação também relatada por Fagan et al. (2016).

#### 4 CONCLUSÃO

1- A inoculação isolada com *A. brasilense* proporciona incrementos na área foliar das plantas de soja cultivar AS 3680 IPRO;

2- O método de inoculação de *A. brasilense* via fertilizante organomineral demonstra eficiência.

#### REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA EM NUTRIÇÃO VEGETAL. **Plano Nacional de Biomassa. 44ª Reunião da Câmara Temática de Insumos Agropecuários – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.** São Paulo: ABISOLO, 2009. Palestra técnica, 16 novembro, 2009. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/camaras-tematicas-1/insumos-agropecuarios>. Acesso em: 15 dez 2015.

ALVES FILHO, A.; CAMARGO, R.; LANA, R. M. Q.; MORAES, M. R. B.; MALDONADO, A. C. D.; ATARASI, R. T. Treatment of sewage sludge with the use of solarization and sanitizing products for agricultural purposes. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 11, n. 3, p. 184-191, Jan., 2016. DOI: 10.5897/AJAR2015.10571. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/944e/1d3a856b6fc1318d2c2d0199b5ebcd8a57ae.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2017.

ARAÚJO JÚNIOR, O. **Soja em sucessão ao capim marandu: efeito do *Azospirillum* associado ao *Bradyrhizobium*.** 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira. 2018.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. In: INFOBIBOS – Informações Tecnológicas. **INFOBIBOS.** Campinas: INFOBIBOS, 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm)>. Acesso em: 14 set. 2018.

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; FINOTO, E. L.; TOKUDA, F. S. ; SANTOS, G. X. L.; MARTINS, M. H.; CORDEIRO-JUNIOR, P. S.; PASQUETTO, J. V. G.; GASPARINO, A. C.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R. S. de; MATEUS, G. P.;

HIPOLITO, J. L.; CAZENTINI-FILHO, G.; CASTELETI, M. L. Avaliação de cultivares de soja no estado de São Paulo em resposta à aplicação de inoculantes no sulco de semeadura. 3º Encontro Técnico Sobre as Culturas da Soja e do Milho no Noroeste Paulista. **Nucleus**, Ituverava, p. 55 – 62, 2018 (Edição Especial). DOI: 10.3738/1982.2278.3001. Disponível em: <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/3001>. Acesso em: 31 out de 2018.

BÁRBARO, I.M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 01-07. 2009. DOI: 10.5747/ca.2009.v05.n1.a0040. Disponível em:< <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/372/510>>. Acesso em: 14 set de 2018.

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da; LIBÓRIO, P. H. da S.; MASSARO SOBRINHO, R.; FINOTO, E. L.; MATEUS, G. P.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R S. de. Viabilidade técnica e econômica da co-inoculação de soja no Estado de São Paulo. **Nucleus**, Ituverava, p.45-58, 2017. (Edição Especial). DOI: 10.3738/1982.2278.2819. Disponível em: <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/2819/2484> Acesso em: 15 out 2018.

BASHAN, Y., BASHAN, L. E., PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998- 2013). **Plant and Soil**, Crawley, v. 378, p. 1-33, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-013-1956-x>. Acesso em: 23 abr de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004**. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2004. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2004/Decreto/D4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Decreto/D4954.htm). Acesso em: 12 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.23, de 31 de agosto de 2005**. Aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2005. Disponível em: [http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN\\_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd](http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd). Acesso em 12 fev. 2017.

BULEGON, L. G. ***Azospirillum brasilense* e reguladores vegetais na mitigação dos efeitos da intoxicação por mesotriona no milho e do déficit hídrico na soja**. 193 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2019.

- BULEGON, L. G., L. RAMPIM, J. KLEIN, D. KESTRING, V. F. GUIMARÃES, A. G. BATTISTUS, E A. M. INAGAKI. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, Chapingo, v, 34, n. 2, p. 169-176, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v34n2/2395-8030-tl-34-02-00169.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2017.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DE SOLOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS - **CFSEMG**. Recomendações para o Uso de Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação. Viçosa, MG, 1999. p. 289-302.
- COPE, J. T.; EVANS, C. E. Soil testing. In STE-WART, B. A. *Advances in soil Science*. New York: **Springer-Verlag**, v. 1, 1985. DOI: 10.1007/978-1-4613-8982-8.
- DREWS, T. A. **Inoculação mista com bradyrhizobium e azospirillum em cultivares de soja sob condição normal e de déficit hídrico do solo**. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil. 1996/97**. Londrina, 1996. 164p. (EMBRAPA-Soja. Documento 96). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/460297/recomendacoes-tecnicas-para-a-cultura-da-soja-na-regiao-central-do-brasil-199697>. Acesso em: 28 jan. 2016.
- FACHINELLI, R. **Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja**. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.
- 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 – Revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2481/1940>. Acesso em: 14 jun. 2018.
- FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SOARES, L. H.; DURVAL NETO, D. **Fisiologia Vegetal: Metabolismo e nutrição mineral**. São Paulo, 2016.
- FERLINI, H. A. Co-inoculación en soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Santa Fé, **Engormix**, 2006. Disponível em: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>. Acesso em: 25 ago. 2015.
- FLAUZINO, D. S.; RIBEIRO, L. M.; CECCON, G. Soja associada à inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* após cultivos de outono-inverno. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 47-53, jan./mar. 2018. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/2001/2069>. Acesso em: 25 ago. 2018.
- FONSECA, G. G. **Respostas de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com estirpes de rizóbios em Minas Gerais**. 166p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FREITAS, D. da S. R. de; SOUZA, J. E. B. de. Resposta agronômica da soja, inoculada com diferentes doses de *Bradyrhizobium* em solo de 1º ano. **Ipê Agronomic Journal**, Goianésia, v.1, n.1, p. 58-70, 2017. Disponível em: <http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/ipeagronicjournal/article/view/1629>. Acesso em: 21 set. 2018.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ROSA, P. A. L.; TRITAPEPE, C. A. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.22, n.1, p.51-56, 2018. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662018000100051](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662018000100051). Acesso em: 15 jan. 2019.

GAZIRE, S. **Avaliação técnica e econômica das tecnologias disponíveis para produção de fertilizantes organominerais**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2016.

GITTI, D. C. Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja. *In*: MELOTTO, A. M.; LOURENÇÃO, A. L. F.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; GRIGOLLI, J. F. J. (ed.). **Tecnologia e Produção Soja 2015/2016**. Maracaju: Fundação MS, 2016. p. 15-24. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br:8080/anuario-tecnologia-e-producao-soja-2015-2016>. Acesso em: 03 out. 2018.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes organominerais**. 2. ed. Ed. Degaspari, Piracicaba, 160 p. 2008.

KHIARI, L.; PARENT, L. E. Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry swine manure. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 85, p. 75- 87, 2005. DOI: 10.4141/S03-049. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/S03-049#.XONJ5chKjIU>. Acesso em: 04 maio 2016.

MALAVOLTA, E. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Informações Agrônomicas**, São Paulo, v. 111, n. 3, p. 10-11, 2005.

MAURÍCIO FILHO, J.; SILVA, C. H. S.; SOUZA, J. E. B. de. Desempenho agronômico e produtividade da cultura da soja com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*. **Ipê Agronomic Journal**, Goianésia, v.2, n.2, p. 48 - 59, 2018. Disponível em: <http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/safaeg/article/view/382/290>. Acesso em: 15 jan. 2019.

MOREIRA, A.; CARVALHO, J. G. de.; EVANGELISTA, A. R. Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 2, p. 249-255, 1999. DOI: 10.1590/S0100-204X1999000200014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X1999000200014&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X1999000200014&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 22 ago. 2017.

MUNDIM, L.M.F; ROCHA, D. K; REIS, C. F.; CARVALHO, E. R. Coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* via sementes de soja no cerrado. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 11, n. 03, p. 10-19, 2018. Disponível em: <https://rv.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/gst/article/view/999/614>. Acesso em: 29 dez. 2018.

- NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com *Azospirillum brasilense* e reguladores vegetais**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2016.
- PARENT, L. E.; KHIARI, L.; PELLERIN, A. The P fertilization of potato: increasing agronomic efficiency and decreasing environmental risk. **Acta Horticulturae**, v. 627, p. 35-41, 2003. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.627.3. Disponível em: [https://www.actahort.org/books/627/627\\_3.htm](https://www.actahort.org/books/627/627_3.htm). Acesso em: 17 set 2017.
- PAVANELLI, L. E.; ARAÚJO, F. F. Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais no oeste paulista. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n.1, p. 21-29, 2009. Disponível em: [www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/6783/4477](http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/6783/4477). Acesso em: 25 ago. 2016.
- RAMOS, L. A.; LANA, R. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H.; SILVA, A. A. Effect of organo-mineral fertilizer and poultry litter waste on sugarcane yield and some plant and soil chemical properties. **African Journal of Agricultural Research**, Grahamstown, v. 12, n. 1, p. 20-27, 2017. DOI: 10.5897/AJAR2016.11024. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/73BA66F62253>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 19, n. 2, p. 227-247, 2000. DOI: 10.1080/07352680091139213. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680091139213>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- RIGO, M. M.; RAMOS, R. R.; CERQUEIRA, A. A.; SOUZA, P. S. A.; MARQUES, M. R. C. Destinação e reuso na agricultura do lodo de esgoto derivado do tratamento de águas residuárias domésticas no Brasil. **Revista Gaia Scientia**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 174-186. 2014. Disponível em: <http://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/viewFile/17550/11550>. Acesso em: 22 jan. 2018.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; Vívian Vieira de MEDEIROS, V. V. de; BARROS, B. G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 28, p. 196 - 202, 2012. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13174>. Acesso em: 23 set. 2016.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBREERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAÚJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed., rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2018.
- SCHNEIDER, F PANIZZON, L. C.; SORDI, A.; LAJÚS, C. R.; CERICATO, A.; KLEIN, C. Eficiência agrônômica da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) submetida a coinoculação. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 72-79, 2017. DOI: 10.5380/rsa.v18i4.52047. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/52047>. Acesso em: 06 ago. 2018.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 303-312, 1993. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301778636>. Acesso em: 19 nov. 2018.

SILVA, F. C. da. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

SINGH, R. K., MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Nusantara Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 8-14, 2013. DOI: 10.13057/nusbiosci/n050102. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.680.8756&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 23 abr. 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.

VITTI, G.C. & LUZ, P.H.C. Manejo químico do solo para alta produtividade da soja. In: CÂMARA, G.M.S., ed. **Tecnologia da produção**. Piracicaba, p.84-112. 1998.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

ZUFFO, A.M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; Neto, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 87-93. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v38n1/v38n1a13.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2018.

ZUFFO, A. M.; BRUZI, A. T; REZENDE, P. M. de; BIANCHI, M. C.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; RIBEIRO, A. B. M.; VILELA, G. L. D. Morphoagronomic and productive traits of RR® soybean due to inoculation via *Azospirillum brasilense* groove. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.13, p. 438-444. 2016. DOI: 10.5897/AJMR2015.7682. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/77E89EA57922>. Acesso em: 12 jan. 2019.

## CAPÍTULO 4

## RESUMO

BARROS, F. C. Doses de *Azospirillum brasilense* via fertilizante organomineral coinoculado com *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja.

A simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas como a soja forma o mais importante sistema de fixação biológica de nitrogênio. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do fertilizante organomineral como veículo de inoculação do *Azospirillum brasilense* e a influência da associação entre o *Bradyrhizobium japonicum* e *A. brasilense* no desenvolvimento da cultura da soja. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com cinco repetições, em esquema fatorial  $4 \times 2 + 1$ , correspondentes à quatro doses de *A. brasilense* (0, 100, 200 e 300 mL  $50 \text{ kg}^{-1}$  de sementes de soja) do produto Masterfix Gramíneas® L, cepas – AbV5 e AbV6 ( $2 \times 10^8$  células viáveis  $\text{mL}^{-1}$ ), com e sem inoculação de *B. japonicum* na dose de 100 mL  $\text{ha}^{-1}$  do produto Masterfix Soja® L, cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 ( $5 \times 10^9$  de células viáveis  $\text{mL}^{-1}$ ) e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos. A parcela experimental foi constituída por cinco sacos plásticos para mudas com aproximadamente 8 L e conduzido na casa de vegetação do Campus Glória – UFU. Foi utilizada a cultivar AS 3680 IPRO. Foram realizadas avaliações fenométricas, análises do metabolismo antioxidante, clorofilas A e B, análises químicas e indicadores de produtividade. A bactéria *A. brasilense* promove proteção fisiológica às plantas contra estresse, principalmente relacionada à atividade da enzima Superóxido Dismutase.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio; Enzimas Antioxidantes; Inoculação mista.

## ABSTRACT

BARROS, F. C. **Doses of *Azospirillum brasilense* via organomineral fertilizer coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum* in soybean crop.**

The symbiosis between nitrogen-fixing bacteria and legumes, such as soybean, forms the most important biological nitrogen fixation system. The objective of this work was to evaluate the efficiency of organomineral fertilizer as an inoculation vehicle of *Azospirillum brasilense* and the influence of the association between *Bradyrhizobium japonicum* and *A. brasilense* on the development of soybean crop. The experiment was conducted in a randomized block design with four replicates, in a  $4 \times 2 + 1$  factorial scheme, corresponding to four doses of *A. brasilense* (0, 100, 200 and 300 mL 50 kg<sup>-1</sup> of soybean seeds) of the product Masterfix Gramíneas® L, AbV5 and AbV6 strains ( $2 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup> viable cells), with and without inoculation of *B. japonicum* at 100 mL ha<sup>-1</sup> of Masterfix Soja® L, SEMIA 5019 and SEMIA 5079 strains ( $5 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup> viable cells) and an additional treatment corresponding to the control (without inoculants and without fertilizer), totaling nine treatments. The experimental plot consisted of five plastic bags for seedlings with approximately 8 L and it was conducted in the greenhouse of Campus Glória - UFU. The cultivar AS 3680 IPRO was used. Phenometric evaluations, antioxidant metabolism, chlorophyll A and B analyzes, chemical analyzes and productivity indicators were performed. The bacterium *A. brasilense* promotes physiological protection to plants against stress, mainly related to the activity of the enzyme *Dismutase Superoxide*.

**Keywords:** Biological fixation of nitrogen; Antioxidant Enzymes; Mixed inoculation.

## 1 INTRODUÇÃO

A simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbios e leguminosas como a soja forma o mais importante sistema de FBN. O processo ocorre nos nódulos, estruturas típicas formadas nas raízes (HUNGRIA et al., 2013), que, após serem formados, permitem que a bactéria passe a fixar o nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos utilizados pela planta.

Além da simbiose com rizóbios, outras BPCP também são capazes de se associarem e realizam uma vasta gama de processos biológicos que beneficiam as plantas, incluindo a produção de hormônios de crescimento e a FBN. O *Azospirillum* é uma BPCP que vem sendo bastante estudada e um dos seus efeitos é o aumento da produção de pelos radiculares e crescimento radicular, beneficiando as plantas com melhor absorção de água e nutrientes (CHIBEBA et al., 2015); e a mitigação de estresse (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

Os efeitos de vários estresses ambientais em plantas, incluindo a deficiência de N promovem espécies reativas de oxigênio (EROs), que inativam enzimas e danificam componentes celulares importantes. Para solucionar tais problemas, as plantas contêm um complexo sistema antioxidante para eliminar as EROs, incluindo enzimas antioxidantes (BARTOLI, 2012; HERNÁNDEZ et al., 2001).

Para incrementar a eficiência da FBN em soja, tem-se como alternativa o uso da coinoculação, uma tecnologia recente no Brasil, que, em sintonia com a abordagem atual da agricultura, respeita as demandas de altos rendimentos, mas também se preocupa com a sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental (BÁRBARO et al., 2008; BÁRBARO et al., 2011; FERLINI, 2006).

Deste modo, para que as pesquisas brasileiras continuem avançando, é necessário desenvolver estudos sobre a dinâmica das populações de rizóbios nos solos, bem como novas tecnologias de inoculação, coinoculação de *Azospirillum*, juntamente com *Bradyrhizobium*, seleção de cultivares e estirpes com maior capacidade simbiótica (BÁRBARO et al., 2011).

Segundo o USDA (2018), o Brasil passou a ser o maior produtor de soja do mundo, com 33% de toda produção mundial. Levando-se em consideração tal fato, a utilização de fertilizantes em grandes quantidades também é assunto de grande relevância

para a cultura. Para uma produção de alto rendimento, não somente o N é importante, mas é peremptório dar atenção também aos demais nutrientes. Para tanto, pesquisas avançam com o uso de fertilizante organomineral, que é a junção de porção orgânica e mineral, conforme legislação brasileira (BRASIL, 2005).

A primeira grande vantagem relativa desses fertilizantes em relação aos minerais é o fato de utilizarem como matéria-prima resíduos que são passivos ambientais de outros sistemas de produção (BENITES et al., 2010).

Como benefícios agronômicos, pode-se citar a redução de perdas de N por volatilização e liberação lenta dos nutrientes; e redução do processo natural de fixação do fósforo lábil (ANTILLE et al., 2014; FERREIRA, 2014), sendo que tais vantagens equiparam sua eficiência à dos fertilizantes minerais.

Ainda existem muitos desafios a serem vencidos que poderão resultar em ganhos de produtividade. Para isso, são necessárias muitas pesquisas aliadas aos produtores rurais, visualizando suas dificuldades para, posteriormente, proporcionar um incremento de tecnologias viáveis, tais como a coinoculação, com o intuito de aumentar os ganhos obtidos com a FBN (LIBÓRIO et al, 2018) e avançar nas pesquisas de utilização de fertilizantes organominerais, promovendo maior sustentabilidade no campo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência das doses de *Azospirillum brasilense*, inoculadas via fertilizante organomineral, de forma isolada ou em adição à inoculação tradicional de *Bradyrhizobium japonicum*, para o desenvolvimento da cultura da soja.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em casa de vegetação do tipo cobertura alta, localizada no *campus* Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, rodovia BR 050, km 78, entre as coordenadas 18°57'30"S e 48°12'0"W, no ano de 2018.

A cultura utilizada foi a soja, cultivar AS 3680 IPRO, genótipo precoce, grupo de maturação 6,8, alta sanidade e potencial produtivo, bom engalhamento. É recomendada para a região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, além do sudoeste de Goiás e norte do Mato Grosso do Sul.

Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições, em esquema fatorial 4×2 +1, correspondentes a quatro doses de *A. brasilense* (0, 100, 200 e

300 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes de soja) do produto Masterfix Gramíneas® L, cepas – AbV5 e AbV6 (2x10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>), com e sem inoculação de *B. japonicum* na dose de 100 mL ha<sup>-1</sup> do produto Masterfix Soja® L, cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 (5x10<sup>9</sup> de células viáveis mL<sup>-1</sup>) e um tratamento adicional correspondente à testemunha (sem inoculantes e sem fertilizante), totalizando nove tratamentos (Tabela 11) e 45 parcelas.

**TABELA 11.** Descrição dos tratamentos utilizados no experimento. UFU, Uberlândia, 2019.

| Dose de <i>A. brasilense</i>                    | <i>B. Japonicum</i> |
|---|---------------------|
| 0   | Sim                 |
| 0   | Não                 |
| 100 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 100 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| 200 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 200 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| 300 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Sim                 |
| 300 mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes             | Não                 |
| Testemunha – sem inoculantes e sem fertilizante |                     |

Todas as plantas, com exceção à testemunha, foram adubadas com fertilizante organomineral peletizado. O bio sólido utilizado como parte orgânica do fertilizante foi proveniente do lodo de esgoto da estação de tratamento do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Uberlândia (DMAE), localizada no município de Uberlândia, MG. O lodo de esgoto foi higienizado, segundo metodologia utilizada por Alves Filho (2016), visando à eliminação dos patógenos e a redução da umidade; e inserida como parte orgânica do adubo pela empresa Geociclo na formulação 3-17-10 com B (0,2 %), Zn (0,3%) e Mn (0,3%).

O fertilizante passou pelo processo de inoculação do *A. brasilense*, realizado a semelhança de um tratamento de sementes: sementes colocadas em sacos plásticos contendo as doses de inoculante, adicionado 0,5 mL de água para facilitar a distribuição do inoculante e agitados para homogeneização, para posterior aplicação no solo. Já a inoculação de *B. japonicum* foi realizada de forma usual sobre a semente.

## 2.1 Condução

O solo utilizado foi coletado no *campus* Glória e classificado como Latossolo Vermelho Ácrico de acordo com Santos et al. (2018). Após homogeneização, secagem e peneiramento, foram retiradas amostras para análise química (Tabela 12).

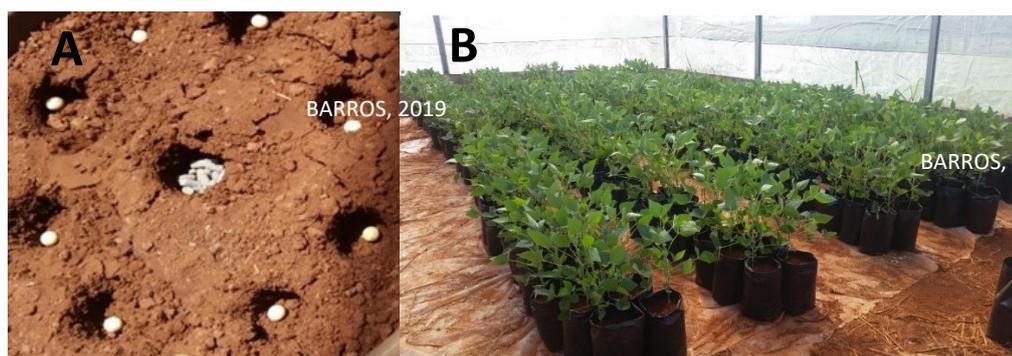
**TABELA 12.** Caracterização química da amostra do solo coletado. UFU. Uberlândia, 2019.

| pH <sub>água</sub><br>1-2,5 | P <sub>meh-1</sub><br>--mg dm <sup>-3</sup> -- | K  | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup>               | Al <sup>3+</sup> | H+Al | SB   | t    | T    |  |
|-----------------------------|--|--|------------------|--------------------------------|------------------|------|------|------|------|--|
|                             |  | ----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ----- |                  |                                |                  |      |      |      |      |  |
| 5,3                         | 4,6  | 0,10   | 1,3              | 0,4                            | 0,2              | 3,70 | 1,80 | 2,00 | 5,50 |  |
| V                           | M  | M.O.   | C.O.             | B Cu Fe Mn Zn                  |                  |      |      |      |      |  |
| ----- % -----               |  | -----dag kg <sup>-1</sup> -----                |                  | -----mg dm <sup>-3</sup> ----- |                  |      |      |      |      |  |
| 33                          | 10   | 1,3  | 0,8              | 0,04                           | 0,2              | 5,0  | 0,1  | 0,2  |      |  |

P, K=(HCL 0.05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0125 mol L<sup>-1</sup>) P disponível (extrator Mehlich<sup>-1</sup>); Ca, Mg, Al (KCl 1 mol L<sup>-1</sup>); H+Al= (Solução Tampão SMP a pH 7.5); SB= Soma de Bases; t= CTC efetiva; T= CTC a pH 7.0; V= Saturação por bases; m= Saturação por Alumínio (EMBRAPA, 1997), M.O = Método Colorimétrico. B = (BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.0125% à quente); Cu, Fe, Mn, Zn= (DTPA 0.005 mol L<sup>-1</sup> + TEA 0.1 mol L<sup>-1</sup> + CaCl<sub>2</sub> 0.01 mol L<sup>-1</sup> a pH 7.3).

A dose do fertilizante organomineral foi definida tendo como referência o teor de P do solo, seguindo a “Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais” (CFSEMG, 1999) e correspondeu a 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

A semeadura foi realizada no dia 08 de dezembro de 2017, na profundidade de três centímetros, em sacos para mudas com aproximadamente 8 litros, sendo colocadas oito sementes por saco, dispostas de forma circular. No centro, foi colocado o fertilizante a 4 cm de profundidade (Figura 4 A). Após 15 dias da semeadura, foram realizados os desbastes visando deixar três plantas por saco, devido aos cortes de plantas necessários para a realização de análises do tipo destrutivas, permanecendo apenas uma planta por saco de muda ao final do experimento. Cada parcela foi composta por seis sacos de mudas (Figura 4 B). O experimento foi conduzido até o final do ciclo da cultivar (R8).



**FIGURA 4.** A) Disposição das sementes de soja, Cultivar AS3681IPRO e do fertilizante organomineral na semeadura. B) Vista geral do experimento. Uberlândia – MG, 2019.

## 2.2 Avaliações

### 2.2.1 Análises Fenométricas

Para a medição da altura das plantas e diâmetro do colo foram utilizados, respectivamente, fita métrica de resolução igual a 1,0 mm e o paquímetro digital do fabricante Digimess de resolução 0,01 mm, sendo medidas seis plantas por parcela nos estádios R3 e R7. A área foliar das plantas foi medida com a utilização de um escâner de folhas do fabricante LI-COR, modelo LI-3100C, resolução 0,1 mm<sup>2</sup>, sendo escaneadas todas as folhas de quatro plantas por parcela no estádio R1 (Figura 5).



**FIGURA 5.** Escaneamento de folhas para obtenção de área foliar (LI-COR, modelo LI-3100C). Uberlândia – MG, 2019.

A determinação de massa seca de parte aérea (MSPA) foi realizada ao final do ciclo da cultura, após colheita das vagens, com seis plantas por unidade experimental, que foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas para secagem. Utilizou-se o método padrão de secagem em estufa com circulação de ar forçada e com temperatura de 65°C até massa constante para posterior pesagem.

### 2.2.2 Teor de Clorofila

Os teores de clorofila A e B foram determinados com um clorofilômetro, do fabricante ClorofiLog, modelo CFL 1030 Falker, com resolução 0,1 Índice de Clorofila Falker (ICF). Foram medidos o teor de clorofila de quatro plantas por parcela, nos estádios V4, V5, V6, R2. As leituras de clorofila foram realizadas na folha média do terceiro trifólio completamente desenvolvido, no limbo foliar, evitando-se as nervuras das folhas.

### 2.2.3 Análises Bioquímicas

As coletas para as determinações bioquímicas foram realizadas nos estádios V3, V6, R2 e R5. As folhas foram coletadas entre 8:00 e 10:00 h da manhã, colocadas em sacos plásticos identificados e envoltas por papel alumínio (Figura 6). As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo e, posteriormente, congeladas com nitrogênio líquido (Figura 7), a fim de paralisar as reações. Foram mantidas congeladas em congelador comum até seguir para o Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, Patos de Minas-MG, sendo então transportadas em caixa térmica contendo gelo seco.



**FIGURA 6.** Folhas coletadas para análise bioquímica A) embaladas em sacos plásticos identificados e B) envoltas por papel alumínio para armazenamento. Uberlândia – MG, 2019.

O material foi utilizado para determinação do teor de proteína total solúvel (PTS), peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidação lipídica (PL), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e Prolina (PROL).



**FIGURA 7.** Folhas coletadas e embaladas recebendo nitrogênio líquido. Uberlândia – MG, 2019.

Para a extração do material vegetal utilizado para determinação de proteína total, catalase, peroxidase e superóxido dismutase, utilizou-se a maceração com nitrogênio

líquido. Posteriormente, 200 mg de material vegetal foram macerados com 4 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. As amostras foram, então, transferidas para microtubos e centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C. Ao final, as amostras foram armazenadas a -20°C (KAR; MISHRA, 1976).

### **2.2.3.1 Teor de proteína total solúvel em folhas**

A determinação do teor de proteína total solúvel na folha foi realizada conforme metodologia descrita por Bradford (1976). A reação é obtida com 20 µL de extrato, adicionando-se 1 mL de reagente de Bradford, e a leitura é realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para obtenção do teor de proteína total solúvel, primeiramente é preparada a curva padrão com caseína. Os dados finais foram expressos em mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca, os quais foram utilizados para os cálculos da atividade da catalase, peroxidase e superóxido dismutase.

### **2.2.3.2 Peroxidase (POD)**

A atividade da POD foi determinada de acordo com Teisseire; Guy (2000). Para isto, foram adicionados a um tubo de ensaio 500 µL de tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5, 30 µL de extrato enzimático, 250 µL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol), 20 mmol L<sup>-1</sup> e 220 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup>, totalizando um volume de 1 mL. Os tubos de ensaio foram deixados em temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, a formação de purpurogalina, que apresenta coloração amarela, foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm. Para o cálculo da atividade da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar da purpurogalina, de 2,5 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, sendo a atividade expressa em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> [proteína].

### **2.2.3.3 Superóxido dismutase (SOD)**

Esta enzima foi avaliada segundo a metodologia de Beauchamp e Fridovich (1971), baseada na formação de formazan (corante). Para isso, é utilizada a riboflavina, também conhecida como vitamina B2. Esse material, quando exposto à luz, reage com aminoácidos (metionina), liberando elétrons. Esses elétrons livres se ligam ao O<sub>2</sub>, formando o radical livre O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Esse radical tem a capacidade de se ligar ao NBT (Nitro Blue Tetrazolium) formando um segundo composto denominado formazan (que possui coloração arroxeadada). Portanto, quando a atividade da SOD é intensa, o O<sub>2</sub><sup>-</sup> é degradado e não ocorre o consumo de NBT, formando uma solução amarela. Se a atividade da SOD

for baixa, haverá  $O_2^-$  livre que, juntamente com o NBT, formará formazina, resultando em uma solução roxa.

Para o preparo dos reagentes, todos os recipientes foram envolvidos com papel alumínio para evitar reação com a luz. Foram adicionados a um tubo de ensaio 2000  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,8, 30  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, 450  $\mu\text{L}$  de solução de Nitro blue Tetrazolium (NBT) + EDTA (5:4) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de Metionina + Riboflavina (1:1). Todas as amostras foram preparadas em duplicata, sendo que, após o preparo do sistema de reação, uma das amostras foi exposta à luz durante 10 min., sem o papel alumínio; e a outra permaneceu com o papel alumínio. Após esse período, foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade da enzima foi expressa em U de SOD  $\text{mg}^{-1}$  proteína, onde U corresponde à quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da redução do NBT.

#### **2.2.3.4 Catalase (CAT)**

Para a determinação da atividade da CAT, foram colocados em um tubo de ensaio 950  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,0 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5  $\text{mmol L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, resultando em um volume final de 1 mL. As leituras de absorbância foram realizadas a 240 nm, durante 60 segundos, para que pudesse ocorrer a estabilização da leitura. As leituras foram realizadas em luz ultravioleta e com a luz visível apagada. Além disso, foram utilizadas cubetas de quartzo (material que permite leituras de absorbância na luz ultravioleta). Para os cálculos da atividade da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 39,4  $\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . A atividade da CAT foi expressa em  $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  [proteína] (PEIXOTO et al., 1999).

#### **2.2.3.5 Peroxidação lipídica (PL)**

Esta análise foi determinada de acordo com a técnica de Heath e Packer (1968). Nesta técnica, é quantificada a formação de malondialdeído (MDA). Este composto é formado após o processo de peroxidação lipídica. Para esta determinação, foram pesados 200 mg do material vegetal moído, que foi homogeneizado em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio com rosca e papel filme e incubado em banho maria à 90°C por 1 h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 15 min. em temperatura ambiente, e, em seguida, o sobrenadante coletado

de cada amostra foi submetido a leituras de absorvância em espectrofotômetro UV-visível a 532 e 600 nm. Para o cálculo da peroxidação lipídica foi utilizado o coeficiente de extinção molar do molondialdeído ( $155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em  $\eta\text{mol}$  de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)  $\text{g}^{-1}$  [MF].

#### **2.2.3.6 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

O teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). Para esta determinação, foi realizada a extração do material vegetal, em que 200 mg de folhas foram maceradas com 1 mL de TCA 0,1%. Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 9700 rpm por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Do sobrenadante foram retirados 200  $\mu\text{L}$ , aos quais foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800  $\mu\text{L}$  de solução 1 M de KI. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante 1 h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390  $\eta\text{m}$ . A quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  [MF].

#### **2.2.3.7 Prolina**

Este aminoácido foi determinado de acordo com o método proposto por Bates et al., (1973). Para esta determinação, foram utilizadas 200 mg de folha fresca e adicionado 5 mL de ácido sulfossalicílico 3%, sendo a mistura deixada em agitação constante por 1h à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, foi realizada a centrifugação das amostras à 3.000 rpm por 10 min, em temperatura ambiente. Em tubos rosqueáveis adicionou-se 1 mL de extrato, 1 mL de ninhidrina ácida (solução que contem 1,25g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial, e 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e 1 mL de ácido acético glacial, deixando-se a mistura em banho-maria ( $100^\circ\text{C}$ ) por 1h, para o desenvolvimento da reação. Em seguida, os tubos de ensaio foram dispostos em banho de gelo por 10 min. para cessar a reação.

Para finalizar, adicionou-se 2 mL de tolueno, a fim de separar a porção orgânica da reação onde estará contida a prolina. Após alguns minutos, houve a formação da mistura bifásica, a qual apenas a fase superior foi retirada para a quantificação dos níveis de prolina livre, por meio de medidas de absorvância a 520  $\eta\text{m}$ . Utilizou-se como branco

apenas o tolueno. O teor de prolina foi calculado com base em curva padrão de prolina e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  [MF].

#### **2.2.4 Análise química**

Após a determinação da MSPA, as plantas foram moídas para realização da análise química foliar. Foram realizadas digestões úmidas (N - método Kjeldahl; P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn - Nitro-perclórica) e seca (B - mufla).

O N, após digestão, passou pela destilação e posterior titulação. O P foi feito correspondendo a determinação com molibdato-vanadato de amônio de reação amarela, leitura feita no espectrofotômetro. Também nesse equipamento foram feitas as leituras de S e B. A leitura do K foi realizada com a utilização do fotômetro de chama. Para Ca, Mg, Fe, Mn, Cu e Zn, utilizou-se o princípio da determinação dos elementos químicos via espectroscopia de absorção atômica com chama.

Para a realização da análise de todos os elementos mencionados, seguiu-se a metodologia descrita pela Embrapa (SILVA, 2009).

#### **2.2.5 Indicadores de Produtividade**

Após o corte das plantas (seis plantas por parcela) no final do ciclo, estágio R8, as vagens foram coletadas e seus grãos retirados para a realização de avaliações. Foi realizada a contagem de grãos para obtenção do número médio de grãos por planta (NMGP), posteriormente sendo feita a pesagem para a obtenção da massa de grãos (MG). As sementes também foram classificadas quanto ao tamanho, com o uso das peneiras de classificação 6,5; 6,0; 5,5; 5,0 e 4,5 mm.

### **2.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram inicialmente testados quanto às pressuposições de normalidade de resíduos (teste de Shapiro-Wilk), homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e aditividade de bloco (Teste de Tukey para aditividade) a 0,01 de significância, utilizando o programa SPSS versão 20.0. Alguns dados foram transformados ( $\sqrt{x}$ ;  $\text{arcseno}\sqrt{x}$ ) para que as pressuposições fossem atendidas.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) realizada pelo teste F, a 5% de probabilidade, comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância pelo software Assistat 7.7. Para as doses de *A. brasilense*, foram

realizadas as regressões linear e quadrática, cujos ajustes das equações foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão a 5% de probabilidade pelo teste F e no maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com o auxílio do software Sisvar 5.6.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Altura de Plantas

Para altura das plantas que foram medidas nos estádios R3 e R7, as médias não apresentaram diferença significativa, porém diferiram da testemunha apresentando valores médios superiores (Tabela 13). A não diferença entre os tratamentos pode ocorrer pela menor disponibilidade de recursos para formação da planta devido à quantidade de indivíduos por área (BALBINOT JÚNIOR et al., 2015).

Giti (2016), Zuffo et al. (2015; 2016) também não observaram diferenças com a inoculação de sementes de soja com apenas *A. brasilense* ou coinoculadas com *B. japonicum* na altura de plantas. Fachinelli (2018), estudando a influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja, também não encontrou influência da inoculação/coinoculação para essa variável.

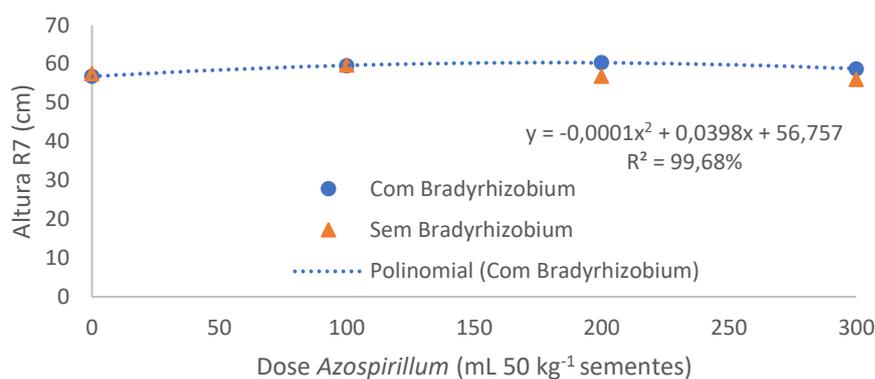
Embora as bactérias do gênero *Azospirillum* realizem a FBN e possam produzir compostos promotores de crescimento ou estimular a produção endógena da planta desses compostos (RODRIGUES et al., 2012), este fato não foi observado no presente estudo.

**TABELA 13.** Altura média de plantas de soja (estádios R3 e R7) submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Altura R3 (cm)             |        | Altura R7 (cm)             |         |
|--|----------------------------|--------|----------------------------|---------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                        | Sem    | Com                        | Sem     |
| <b>0</b>   | 55,15*                     | 54,77* | 56,79*                     | 57,50*  |
| <b>100</b>   | 58,93*                     | 57,98* | 59,53*                     | 59,73*  |
| <b>200</b>   | 59,21*                     | 55,25* | 60,40*                     | 56,80*  |
| <b>300</b>   | 57,52*                     | 53,22* | 58,73*                     | 56,00*  |
| <b>Média</b>   | 57,7 A                     | 55,3 A | 58,87 A                    | 57,51 A |
| <b>Testemunha</b>  | 40,39                      |        | 42,42                      |         |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>1,254; 0,966; 0,685</b> |        | <b>1,822; 0,912; 0,920</b> |         |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau para altura de plantas no estágio R7 com inoculação de *B. japonicum*. A equação demonstra que a altura máxima de plantas (60,72 cm) foi alcançada com a dose 199 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, doses superiores a essa promoveram decréscimo na altura das plantas (Figura 8).



**FIGURA 8.** Altura de plantas de soja no estágio R7 na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.2 Diâmetro de colo

Para a variável diâmetro de colo, os tratamentos diferiram da testemunha, apresentando maiores valores médios (Tabela 14), situação semelhante a encontrada para altura de plantas. A não diferença nessa variável pode estar relacionada ao número de plantas dentro do saco de mudas. O acúmulo de plantas pode provocar o desenvolvimento de plantas mais altas, menos ramificadas, com menor produção individual e diâmetro de haste reduzido (ENDRES, 1996). Este fato ocorre porque a disponibilidade de recursos para formação da planta é menor à medida que há incremento da quantidade de indivíduos por área (BALBINOT JÚNIOR et al., 2015).

Bulegon et al. (2016b) relataram que, para diâmetro de colo, os diferentes tratamentos (*A. brasilense*; *B. japonicum*; *A. brasilense* + *B. japonicum*) não apresentaram diferença entre si. Em contrapartida, Rengel et al. (2018) afirmam que houve superioridade nos resultados para os tratamentos onde foi realizada a associação das bactérias *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* + *B. ekanii*) e *A. brasilense* para a variável diâmetro de colo.

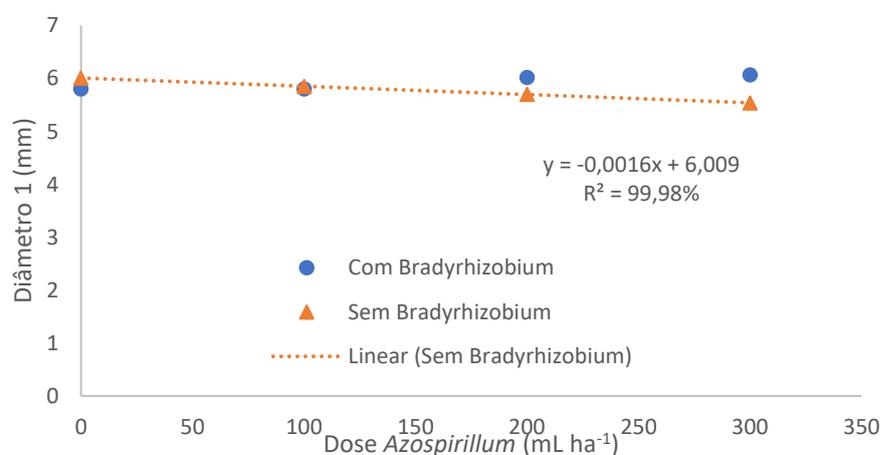
Segundo Gomes et al. (2017), o aumento da densidade de plantas na linha proporcionou redução no diâmetro do caule. Em estudo desenvolvido por Solano; Yamashita (2012), em relação ao diâmetro do caule das plantas, foi determinado que a significância ocorreu apenas para o fator espaçamento, portanto é provável que esta variável não seja responsiva aos microrganismos inoculados.

**TABELA 14.** Diâmetro médio do colo de plantas de soja, nos estádios R3 e R7, submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

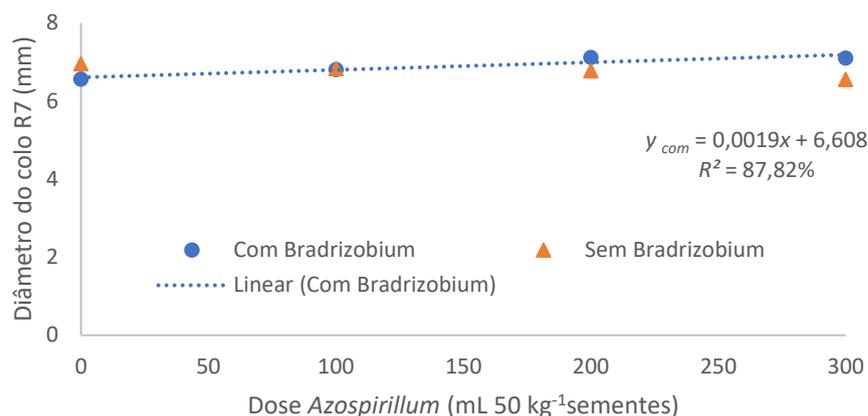
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Diâmetro R3 (mm)           |        | Diâmetro R7 (mm)           |        |
|--|----------------------------|--------|----------------------------|--------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                        | Sem    | Com                        | Sem    |
| 0  | 5,73*                      | 6,01*  | 6,58*                      | 6,95*  |
| 100  | 5,80*                      | 5,84*  | 6,81*                      | 6,83*  |
| 200  | 6,01*                      | 5,73*  | 7,12*                      | 6,77*  |
| 300  | 6,07*                      | 5,53*  | 7,10*                      | 6,55*  |
| <b>Média</b>   | 5,90 A                     | 5,78 A | 6,90 A                     | 6,77 A |
| <b>Testemunha</b>  | 4,36                       |        | 5,17                       |        |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>1,714; 0,959; 0,250</b> |        | <b>0,251; 0,943; 0,922</b> |        |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Observou-se que o diâmetro de colo das plantas em R3 reduziu linearmente 0,0016 cm a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* na ausência da inoculação de *B. japonicum* (Figura 9), indicando prejuízo para as plantas neste estágio. Por sua vez, o diâmetro de colo das plantas em R7 aumentou linearmente 0,0019 cm a cada 1 mL de acréscimo nas doses de *A. brasilense* com a inoculação de *B. japonicum* (Figura 10).



**FIGURA 9.** Diâmetro médio do colo de plantas de soja no estágio R3 na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 10.** Diâmetro médio do colo de plantas de soja no estágio R7, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.3 Massa Seca de Parte Aérea (MSPA)

A variável MSPA não apresentou respostas diferentes entre os fatores em estudo, mas diferiram da testemunha apresentando maiores médias (Tabela 15), semelhante ao observado para altura de plantas e diâmetro de colo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bulegon et al. (2016b), que ao trabalharem com formas de coinoculação (sulco e sementes), não verificaram diferenças entre as inoculações isoladas ou combinadas para massa seca da parte aérea de plantas de soja em estágio V4.

**TABELA 15.** Massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | MSPA (g)                   |        |
|--|----------------------------|--------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                        | Sem    |
| 0  | 2,89*                      | 3,09*  |
| 100  | 3,03*                      | 3,10*  |
| 200  | 3,35*                      | 2,98*  |
| 300  | 3,08*                      | 2,87*  |
| <b>Média</b>   | 3,09 A                     | 3,01 A |
| <b>Testemunha</b>  | 1,11                       |        |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>0,640; 0,983; 5,117</b> |        |

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Drews (2016) em seu trabalho, cujo solo foi coletado em área de produção de soja, relatou diferença para massa seca da parte aérea, em que a inoculação mista (*B. japonicum* + *A. brasilense*) apresentou resultados superiores ao tratamento controle sem *A. brasilense* para os cultivares, M 8372 IPRO e M 7739 IPRO.

### 3.4 Área foliar (AF)

As médias não diferiram significativamente, mas obtiveram melhores resultados com relação à testemunha, exceto o tratamento de 300 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes e sem *B. japonicum* (Tabela 16).

Quando analisado o efeito das inoculações sobre a cultura da soja em estágio V4, Fachinelli (2018) evidenciou que o tratamento com *Bradyrhizobium* induziu um maior número de trifólios que os tratamentos com nitrogênio e com *Azospirillum*. Os resultados apresentados por este autor, no entanto, não influenciaram a área foliar, denotando não ocorrer alteração na área fotossintética das plantas com a variação do número de trifólios.

Os dados obtidos confirmam os resultados encontrados por Bulegon et al. (2016b), que ao trabalharem com formas de coinoculação (sulco e sementes) não verificaram diferenças entre as inoculações isoladas ou combinadas para área foliar de plantas de soja em estágio V4. Entretanto, no estágio V6, a coinoculação nas sementes proporcionou incremento de 14,2% para área foliar.

**TABELA 16.** Médias de área foliar de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum*, em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | Média AF (cm <sup>2</sup> ) |          |
|--|-----------------------------|----------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>       |          |
|  | Com                         | Sem      |
| 0  | 1549,07*                    | 1657,67* |
| 100  | 1423,63*                    | 1494,31* |
| 200  | 1785,32*                    | 1618,63* |
| 300  | 1537,4*                     | 1258,86  |
| <b>Média</b>   | 1573 A                      | 1507 A   |
| <b>Testemunha</b>  | 778,96                      |          |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>0,199; 0,958; 3,816</b>  |          |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

### 3.5 Teor de Clorofila

Os teores de clorofila A e B não apresentaram diferença significativa comparados à testemunha no estágio V4. No estágio vegetativo V5, para clorofila A, as plantas tratadas com a dose de 100 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com e sem *B. japonicum*, apresentaram médias estatisticamente mais elevadas do que as plantas sem tratamento (testemunha), assim como as plantas tratadas com a dose de 200 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com *B. japonicum*. Para clorofila B, os tratamentos com médias superiores à testemunha foram os mesmos que para a clorofila A, adicionado ao tratamento com dose de 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, sem *B. japonicum* (Tabela 17).

No estágio V6, todos os valores médios foram superiores à testemunha, tanto para clorofila A quanto B. Já no estágio R2, o tratamento com 200 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes apresentou melhor resultado quando coinoculado com *B. japonicum* para ambas clorofilas. Neste estágio, todos os tratamentos se mostraram superiores à ausência de inoculação e fertilizante, com exceção à dose de 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes e sem *B. japonicum* para a clorofila B (Tabela 17).

Ao observar o conjunto de dados, pode-se inferir que as diferenças estatísticas significativas foram surgindo ao longo do ciclo da cultura. Na primeira medição, é possível observar ausência completa de diferença significativa e, na última, efeito significativo entre os tratamentos. Como o teor de clorofila correlaciona-se com a concentração de N na planta (SILVA et al., 2012), tal fato pode ser explicado devido à fixação biológica de nitrogênio, pois segundo Fagan et al. (2007), a partir do estágio V5, se tem uma maior atividade por parte dos nódulos e, no estágio R2, há uma elevada eficiência da fixação biológica.

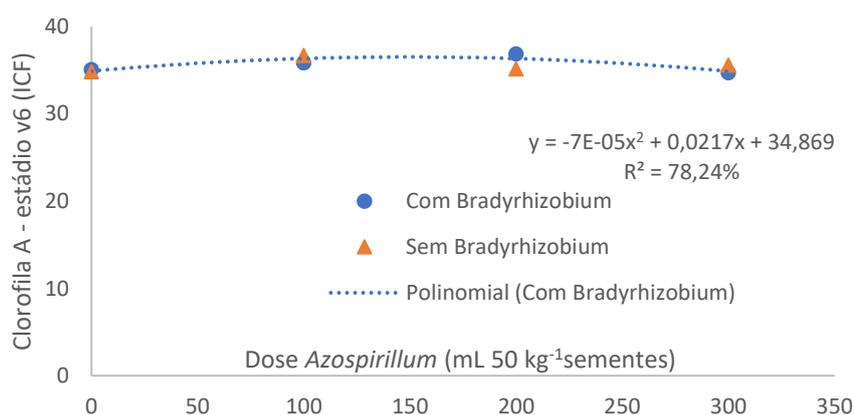
Observa-se que comportamento semelhante ocorre quanto à proporção entre as clorofilas A e B. Segundo Von Elbe (2000), as clorofilas A e B encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente. Contudo, essa proporção varia com a espécie, etapa do ciclo da planta, condições de crescimento e fatores ambientais (TAIZ; ZIEGER, 2004). No presente trabalho em que foram feitas quatro leituras (V4, V5, V6 e R2), a proporção inicia-se em 4:1 e vai reduzindo ao longo do desenvolvimento do ciclo da cultura até chegar a aproximadamente 3:1, proporção mais comumente observada.

A proporção entre as clorofilas foi alterada principalmente pelo aumento dos teores de clorofila B em R2, pois esse estágio marca o início de um período de rápido e

constante acúmulo diário das taxas de matéria seca e de nutrientes pela planta devido ao pleno florescimento (CÂMARA, 2006). A quantidade mais elevada de clorofila B (considerada um pigmento acessório) complementa a captação da luz para realizar a fotossíntese, o que pode ser explicado com base nas suas propriedades de absorção da luz. A clorofila B é capaz de absorver fortemente entre 450 e 480 nm, enquanto a clorofila A absorve fortemente entre 400 e 450 nm (GROSS, 1991).

Todavia, Schneider et al. (2017) não observaram diferença significativa nos teores de clorofila cujas análises foram realizadas nos estádios V5 e R2. Drews (2016) também não verificou em seu trabalho diferença significativa para esta variável, que foi realizada em estágio R2. Araújo Júnior (2018) não constatou diferença entre inoculação com *Bradyrhizobium* e coinoculação com *Azospirillum* para os teores de clorofila nas folhas da cultura da soja no estágio R1. Em estudo realizado por Zuffo et al. (2016) e Zuffo et al. (2015), esta variável também não se mostrou responsiva aos tratamentos de inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau para teor de clorofila A das plantas no estágio V6. A equação demonstra que o maior teor de clorofila A (36,55 ICF) foi alcançado com a dose de 155 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum*. Doses superiores a essas promoveram decréscimo nos teores de clorofila A (Figura 11).



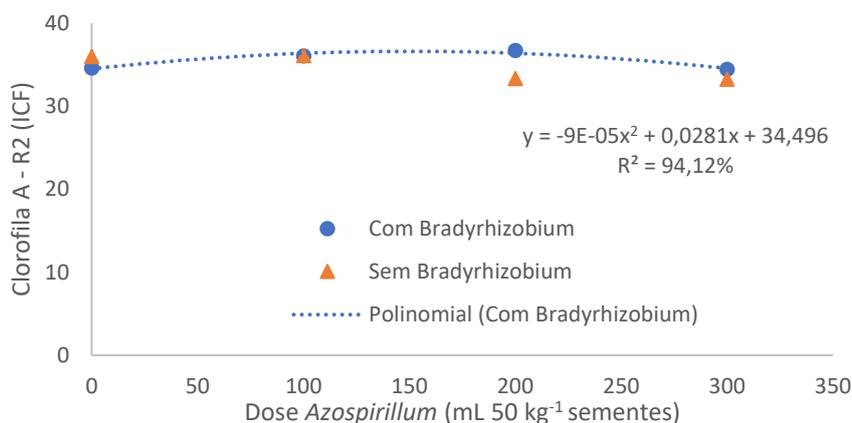
**FIGURA 11.** Média do teor de clorofila de plantas de soja no estágio V6, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

**TABELA 17.** Média do teor de clorofila A e B (ICF) de plantas de soja nos estádios V4, V5, V6 e R2 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

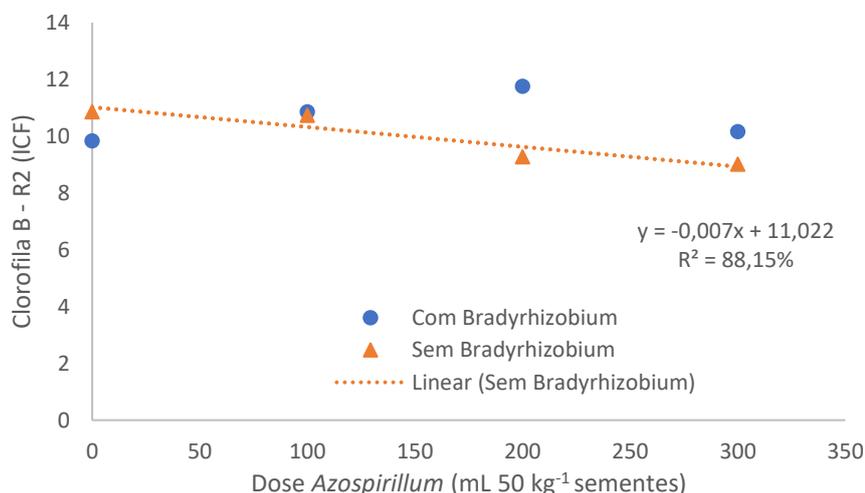
| Experimento 2  |                            |         |                            |         |                            |          |                            |          |
|--|----------------------------|---------|----------------------------|---------|----------------------------|----------|----------------------------|----------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V4                         |         |                            |         | V5                         |          |                            |          |
|  | Clorofila A                |         | Clorofila B                |         | Clorofila A                |          | Clorofila B                |          |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |          | <i>Bradyrhizobium</i>      |          |
|  | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     | Com                        | Sem      | Com                        | Sem      |
| 0  | 33,28                      | 34,24   | 8,1                        | 8,96    | 34,74                      | 34,54    | 9,24                       | 9,2      |
| 100  | 33,46                      | 34,54   | 8,68                       | 9,08    | 35,32*                     | 35,66*   | 9,60*                      | 9,94*    |
| 200  | 28,55                      | 34,4    | 9,18                       | 8,98    | 36,28*                     | 34,1     | 10,32*                     | 8,92     |
| 300  | 32,46                      | 33,7    | 8,2                        | 8,58    | 35,14                      | 34,64    | 9,26                       | 9,58*    |
| Média  | 31,94 A                    | 34,22 A | 8,54 A                     | 8,90 A  | 35,37 A                    | 34,74 A  | 9,61 A                     | 9,41 A   |
| Testemunha   | 31,28                      |         | 7,68                       |         | 32,8                       |          | 7,64                       |          |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | 3,589; 0,716; 95,749       |         | <b>0,734; 0,962; 1,991</b> |         | <b>0,552; 0,933; 1,114</b> |          | <b>0,083; 0,954; 2,237</b> |          |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V6                         |         |                            |         | R2                         |          |                            |          |
|  | Clorofila A                |         | Clorofila B                |         | Clorofila A                |          | Clorofila B                |          |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |          | <i>Bradyrhizobium</i>      |          |
|  | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     | Com                        | Sem      | Com                        | Sem      |
| 0  | 10,22*                     | 10,38*  | 10,22*                     | 10,38*  | 34,60 A*                   | 35,98 A* | 9,84 A*                    | 10,86 A* |
| 100  | 10,76*                     | 11,40*  | 10,76*                     | 11,40*  | 36,06 A*                   | 36,10 A* | 10,86 A*                   | 10,74 A* |
| 200  | 11,56*                     | 10,26*  | 11,56*                     | 10,26*  | 36,70 A*                   | 33,34 B* | 11,76 A*                   | 9,28 B*  |
| 300  | 10,64*                     | 10,66*  | 10,65*                     | 10,66*  | 34,44 A*                   | 33,24 A* | 10,16 A*                   | 9,02 A   |
| Média  | 10,80 A                    | 10,68 A | 10,80 A                    | 10,68 A | -                          | -        | -                          | -        |
| Testemunha   | 7,7                        |         | 7,7                        |         | 29,9                       |          | 7,42                       |          |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>1,129; 0,936; 3,924</b> |         | <b>0,771; 0,960; 3,917</b> |         | <b>1,302; 0,982; 0,387</b> |          | <b>2,447; 0,972; 7,721</b> |          |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Também apresentaram ajuste significativo as doses de *A. brasilense* utilizando modelo polinomial de segundo grau para teor de clorofila A e linear para clorofila B das plantas no estágio R2. A equação demonstra que o maior teor de clorofila A (36,69 ICF) foi alcançado com a dose de 156,11 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum*. Doses superiores a essas promoveram decréscimo nos teores de clorofila A (Figura 12). Para clorofila B, observou-se que o teor em R2 reduziu linearmente 0,007 ICF a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* na ausência da inoculação de *B. japonicum* (Figura 13), indicando prejuízo para as plantas neste estágio.



**FIGURA 12.** Média do teor de clorofila A de plantas de soja no estágio R2, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 13.** Média do teor de clorofila B de plantas de soja no estágio R2, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.6 Proteína Total Solúvel (PTS)

As proteínas são os principais alvos biológicos dos radicais livres, promovendo a perda de função ou a degradação prematura nos proteossomas devido à oxidação. Esta afeta também os lipídios, alterando as propriedades físicas das membranas celulares e, conseqüentemente, a sua função; e o DNA, cuja oxidação pode conduzir a mutações gênicas, a síntese anormal de proteínas, a alteração na expressão gênica e a morte celular (SORG, 2004).

Apenas as plantas tratadas com 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> sementes coinoculadas com *B. japonicum* apresentaram diferença significativa com relação à testemunha em todos os estádios avaliados. Somente no estádio V3 a presença e ausência de *B. japonicum* apresentou diferença (Tabela 18).

**TABELA 18.** Média do teor de Proteína Total Solúvel (PTS) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

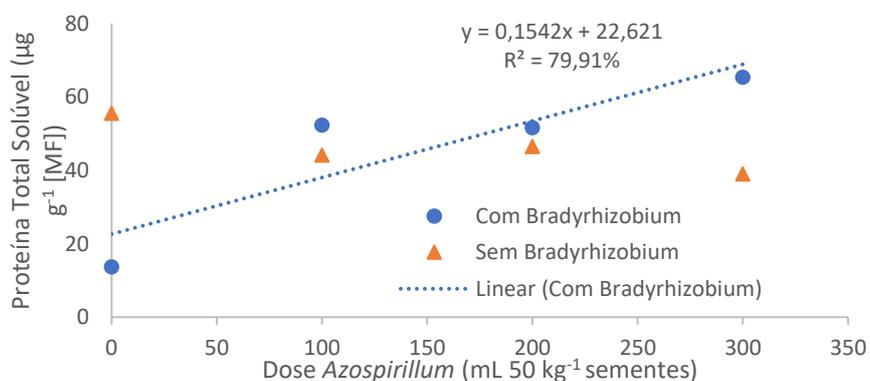
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | PTS (mg g <sup>-1</sup> [MF]) |         |                            |         |
|--|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|
|  | V3                            |         | V6                         |         |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>         |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                           | Sem     | Com                        | Sem     |
| 0  | 13,72 B                       | 55,54 A | 29,6                       | 42,63   |
| 100  | 52,31 A                       | 44,14 A | 33,8                       | 35,78   |
| 200  | 51,61 A                       | 46,48 A | 35,7                       | 30,17   |
| 300  | 65,33 A*                      | 38,97 B | 46,66*                     | 36,21   |
| <b>Média</b>   | -                             | -       | 36,44 A                    | 36,20 A |
| <b>Testemunha</b>  | 21,00                         |         | 25,74                      |         |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>2,807; 0,979; 2,023</b>    |         | <b>3,308; 0,930; 1,343</b> |         |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                            |         | R5                         |         |
|  |                               |         |                            |         |
|  |                               |         |                            |         |
| 0  | 39,06                         | 46,48   | 41,00                      | 48,01*  |
| 100  | 37,49                         | 40,98   | 36,67                      | 39,25   |
| 200  | 40,40                         | 39,82   | 40,48                      | 31,95   |
| 300  | 55,77*                        | 55,88*  | 60,67*                     | 44,16   |
| <b>Média</b>   | 43,18 A                       | 45,75 A | 44,70 A                    | 40,84 A |
| <b>Testemunha</b>  | 27,41                         |         | 26,04                      |         |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>1,012; 0,994; 2,699</b>    |         | <b>0,669; 0,971; 0,026</b> |         |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

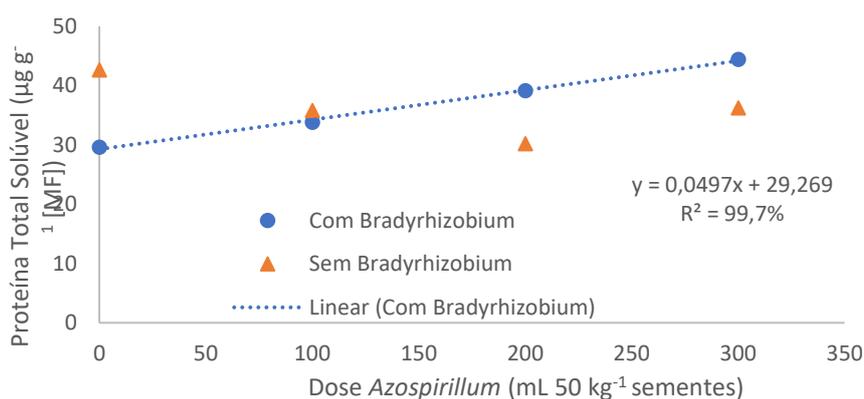
Teixeira (2016) observou que doses de 8,8 mg [glicina] kg<sup>-1</sup> semente promoveu um acréscimo do teor de PTS em soja. Bulegon et al. (2016a) relataram que, em sua pesquisa sobre inoculação e déficit hídrico em *Urochloa ruziziensis*, o maior teor de proteína solúvel no início do estresse hídrico foi obtido com a inoculação das sementes com *A. brasilense*.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando-se modelo linear nos estádios V3 e V6. Observou-se que o teor de PTS das plantas em V3 aumentou linearmente 0,1542 mg g<sup>-1</sup> [MF] a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* com inoculação de *B. japonicum* (Figura 14). Enquanto em V6 o teor de PTS das plantas aumentou linearmente 0,0497 mg g<sup>-1</sup> [MF] a cada 1 mL de acréscimo nas doses de *A. brasilense* com a inoculação de *B. japonicum* (Figura 15).

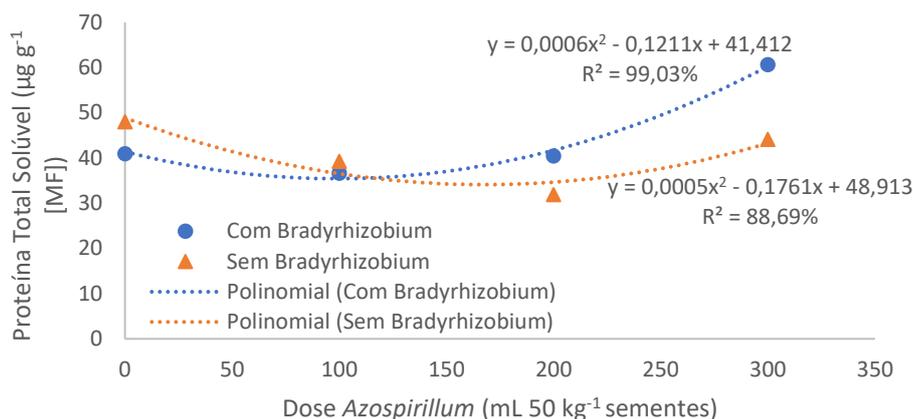
Também apresentaram ajuste significativo as doses de *A. brasilense* utilizando modelo polinomial de segundo grau para teor PTS no estágio R5. As equações demonstraram que os menores teores de PTS (35,30; 33,41 mg g<sup>-1</sup> [MF]) foram alcançados com as doses de 100,92 e 176,1 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com e sem a inoculação de *B. japonicum*, respectivamente (Figura 16).



**FIGURA 14.** Média do teor de PTS de plantas de soja no estágio V3, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 15.** Média do teor de PTS de plantas de soja no estágio V6, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 16.** Média do teor de PTS de plantas de soja no estágio R5, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.7 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é a principal linha de defesa contra as EROs, dismutando o superóxido ( $O_2^{\circ-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SCANDALIOS, 2005). Ocorre a redução da enzima pelo superóxido, formando oxigênio, com isso, a enzima reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando como produto o  $H_2O_2$ , que sofre dismutação pela catalase ou outra peroxidase, originando  $H_2O$  e  $O_2$  (BERG et al. 2004).

Neste experimento, a maior atividade da SOD foi observada no tratamento contendo apenas *B. japonicum*, no estágio V3, demonstrando maior nível de estresse. Este resultado infere que o *A. brasilense* atuou protegendo as plantas contra o estresse ocasionado pela infecção por *B. japonicum*. Em V6, a enzima analisada apresentou, em geral, menores atividades com a presença de *A. brasilense* em comparação à testemunha (Tabela 19).

No estágio R2, os resultados permaneceram semelhantes, sendo que as plantas inoculadas apenas com *B. japonicum* apresentaram uma recuperação no nível de estresse, fato esperado, já que o *B. japonicum* é um micro-organismo co-evoluído com a soja (RIBEIRO et al., 2013; XU et al., 2013). Em R5, observa-se que há um aumento da atividade da SOD na testemunha, fato este que ocorre devido à idade das plantas se aproximando da senescência. Segundo Bor et al. (2003), no decorrer da senescência, dentre outras alterações, observa-se aumento nas EROs e as plantas tendem a tentar regular os níveis de espécies reativas. Mais uma vez observa-se que o *A. brasilense* conferiu uma certa proteção às plantas, tendo as plantas tratadas com este micro-organismo apresentado menor atividade da SOD (Tabela 19).

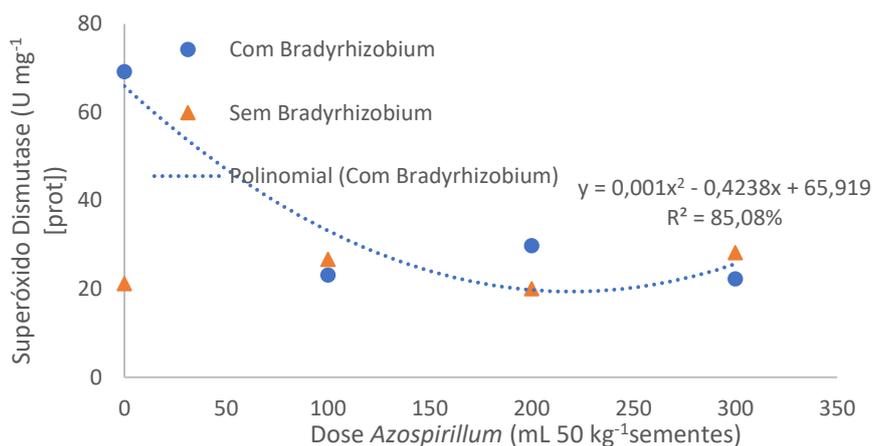
Resultados semelhantes foram verificados em estudo realizado por Müller (2016), tendo em vista que os híbridos de milho AG9045 e BG7051 apresentaram maior atividade da SOD quando houve a ausência da bactéria *A. brasilense* (tratamento controle). Soares (2017), analisando os resultados do metabolismo oxidativo, verificou que as cultivares de soja e os tratamentos com bioestimulantes não alteraram a atividade da SOD. Em contrapartida, Bulegon et al. (2016a) afirmam que a inoculação de folhas *Urochloa ruziziensis* com *A. brasilense* promoveu aumento das atividades de SOD sob estresse hídrico severo.

**TABELA 19.** Média da atividade de superóxido dismutase (SOD) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

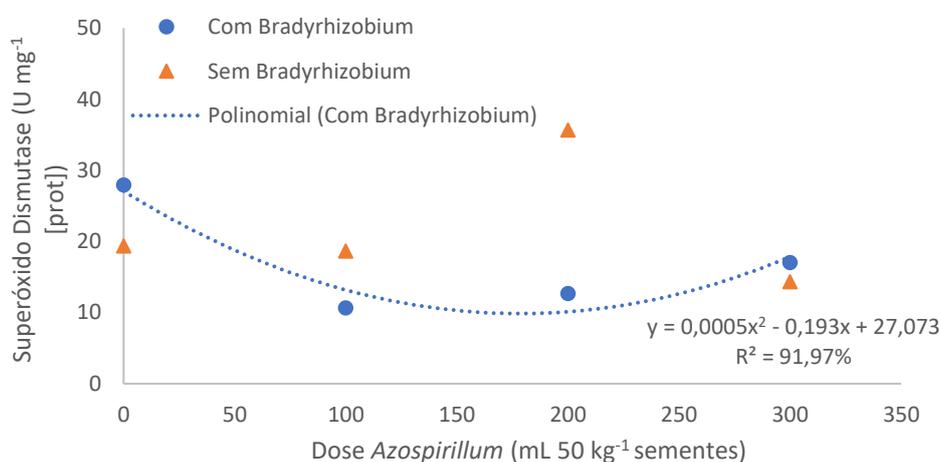
| SOD (U $\mu\text{g}^{-1}$ [proteína])                      |                            |         |                             |          |
|--|----------------------------|---------|-----------------------------|----------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V3                         |         | V6                          |          |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>       |          |
|  | Com                        | Sem     | Com                         | Sem      |
| 0  | 69,26 A*                   | 21,21 B | 27,92 A                     | 19,33 B* |
| 100  | 23,17 A                    | 26,75 A | 10,64 B*                    | 18,64 A* |
| 200  | 29,80 A                    | 20,06 A | 12,65 B*                    | 35,66 A  |
| 300  | 22,32 A                    | 28,26 A | 17,01 A*                    | 14,33 A* |
| <b>Média</b>   | -                          | -       | -                           | -        |
| <b>Testemunha</b>  | 27,29                      |         | 33,82                       |          |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>3,544; 0,947; 0,941</b> |         | <b>2,776; 0,981; 0,248</b>  |          |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                         |         | R5                          |          |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>       |          |
|  | Com                        | Sem     | Com                         | Sem      |
| 0  | 22,61*                     | 12,59*  | 28,23 A                     | 12,56 B* |
| 100  | 25,20                      | 17,06*  | 31,33 A                     | 18,87 A* |
| 200  | 19,08*                     | 15,37*  | 21,40 A*                    | 17,53 A* |
| 300  | 13,92*                     | 17,17*  | 10,79 A*                    | 19,04 A* |
| <b>Média</b>   | 20,20 A                    | 15,55 A | -                           | -        |
| <b>Testemunha</b>  | 37,68                      |         | 42,04                       |          |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>3,624; 0,906; 7,708</b> |         | <b>1,409; 0,978; 10,131</b> |          |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau para a atividade de SOD das plantas no estádio V3 e V6. As equações demonstram que as menores atividades de SOD, 21,0174 e 8,4485 U  $\mu\text{g}^{-1}$  [proteína] foram alcançadas com as doses de 211,9 e 193 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum*, respectivamente (Figuras 17e 18), sendo, portanto, estas as doses que promoveram menores níveis de estresse sinalizado pela SOD.

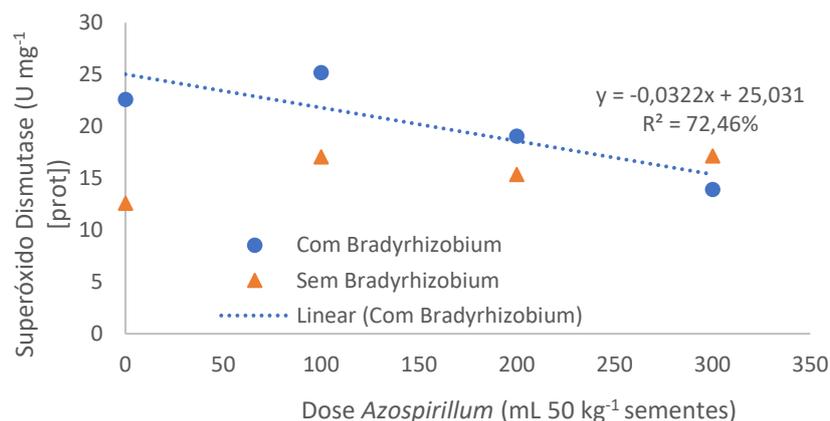


**FIGURA 17.** Média do teor de SOD de plantas de soja no estágio V3, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

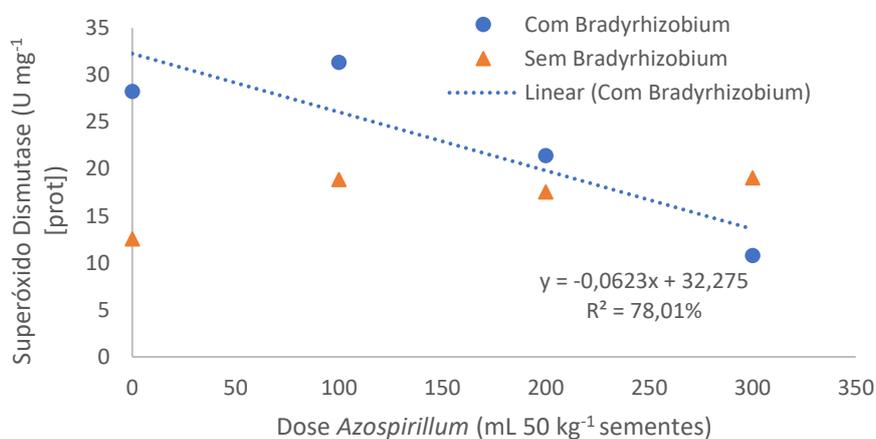


**FIGURA 18.** Média do teor de SOD de plantas de soja no estágio V6 na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

Nos estádios R2 e R6, as doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando modelo linear. Observou-se que a atividade de SOD em plantas decresceu linearmente 0,0322 e 0,0623 U  $\mu\text{g}^{-1}$  [proteína] a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* com inoculação de *B. japonicum*, respectivamente (Figuras 19 e 20), demonstrando melhoria no nível de estresse sinalizado pela SOD com o aumento na dose de *A. brasilense*.



**FIGURA 19.** Média do teor de SOD de plantas de soja no estágio R2, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 20.** Média do teor de SOD de plantas de soja no estágio R6, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.8 Catalase (CAT)

As CATs são enzimas de oxidorreductase, presentes em todas as células de plantas, animais e microrganismos aeróbicos, comumente encontradas nos peroxissomos e glioxissomas. A CAT, juntamente com a SOD, é considerada a mais eficiente entre as enzimas antioxidantes e possui a capacidade de degradar rapidamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> e, por isso, é muito importante no sistema antioxidativo (SCANDALIOS, 1993).

A atividade da enzima CAT, nos estádios V3 e V6, não apresentou diferença entre a presença e ausência de *B. japonicum*, porém sua atividade foi menor comparada à testemunha (Tabela 20). Nestes estádios, como a testemunha apresentou atividade de CAT maiores e este é o único tratamento que não foi fertilizado com organomineral, pode-se supor uma interferência do fertilizante na atividade desta enzima. Silva (2017) relatou

redução de atividade da CAT em soja com a aplicação de 150 Kg ha<sup>-1</sup> de fertilizante organomineral.

Segundo Vasconcelos et al. (2009), os organominerais contêm uma diversidade de compostos, entre eles alguns com propriedades antioxidantes. A utilização destes produtos causa aumento na atividade das enzimas de defesa contra o estresse oxidativo, o que torna as plantas mais tolerantes.

Em R2 e R6 não foram observadas diferenças comparadas à testemunha (Tabela 20).

**TABELA 20.** Média da atividade de Catalase (CAT) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5, no experimento 2, submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| CAT ( $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ [proteína]) |                            |                    |                            |         |
|--|----------------------------|--------------------|----------------------------|---------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V3                         |                    | V6                         |         |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |                    | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                        | Sem                | Com                        | Sem     |
| 0  | 161,36*                    | 89,01*             | 28,41*                     | 3,89*   |
| 100  | 18,16*                     | 39,94*             | 15,69*                     | 10,61*  |
| 200  | 35,35*                     | 19,03*             | 23,23*                     | 42,15*  |
| 300  | 32,32*                     | 48,76*             | 9,46*                      | 22,50*  |
| <b>Média</b>   | 61,80A                     | 49,19 <sup>a</sup> | 19,20 A                    | 19,78 A |
| <b>Testemunha</b>  | 203,00                     |                    | 139,35                     |         |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | 4,524; 0,901; <b>4,902</b> |                    | 10,358; 0,813; 100,468     |         |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                         |                    | R5                         |         |
| 0  | 48,58 A                    | 37,23 A            | 56,43                      | 25,17   |
| 100  | 72,80 A                    | 22,29 B            | 75,54                      | 30,51   |
| 200  | 43,84 A                    | 56,37 A            | 58,12                      | 83,72   |
| 300  | 51,32 A                    | 30,03 A            | 56,63                      | 67,87   |
| <b>Média</b>   | -                          | -                  | 61,68 A                    | 51,82 A |
| <b>Testemunha</b>  | 50,13                      |                    | 66,24                      |         |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>1,304; 0,960; 1,188</b> |                    | <b>2,306; 0,892; 0,034</b> |         |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Diferentemente, Bulegon et al. (2016a) afirmaram que a inoculação de folhas de *Urochloa ruziziensis* com *A. brasilense* promoveu aumento das atividades de CAT sob estresse hídrico severo. Deuner et al. (2008) estudando a influência da pulverização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido ascórbico na atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro, observou que, nas plantas pulverizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a enzima CAT teve sua atividade aumentada a partir da primeira hora de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Gonçalves (2017), estudando atividade de enzimas antioxidantes em regimes de estresse hídrico, afirmou que os resultados encontrados em seu experimento indicam que a atividade de CAT foi estável para todos os níveis de manejo hídrico, mas variou entre estádio e cultivar. No estádio V2, verificou que as plantas convencionais apresentaram alta atividade de CAT quando comparadas às plantas transgênicas.

### 3.9 Peroxidase (POD)

As PODs são hemoproteínas de oxidoredutase específicas para acceptor de hidrogênio (ALFENAS, 1998). Além disso, são consideradas as mais importantes enzimas na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no citosol e nos cloroplastos (INZÉ; VAN MONTAGU, 1995). Sua atividade está diretamente ligada ao estresse, sendo frequentemente aumentada por essa razão (SIEGEL, 1993).

A atividade desta enzima, no presente trabalho, não se mostrou sensível à coinoculação, não diferindo estatisticamente quando as plantas foram inoculadas com ao menos um dos microrganismos. Em V3 e V6 foram observadas diferenças entre a presença ou ausência do *B. japonicum* apenas na ausência de *A. brasilense*. Em V3 o tratamento que contou apenas com *B. japonicum* obteve maior atividade da enzima comparado à testemunha (Tabela 21), a semelhança do observado para a SOD, pois a POD decompõe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido nas reações catalisadas pela SOD (BOR et al., 2003).

No estádio R2, os tratamentos com ausência de inoculantes e com 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> sementes, isoladas ou coinoculadas com *B. japonicum*, apresentaram menores atividades de POD do que a testemunha. Estes mesmos tratamentos também apresentaram menor atividade de SOD. Em R5 nenhuma diferença foi observada (Tabela 21).

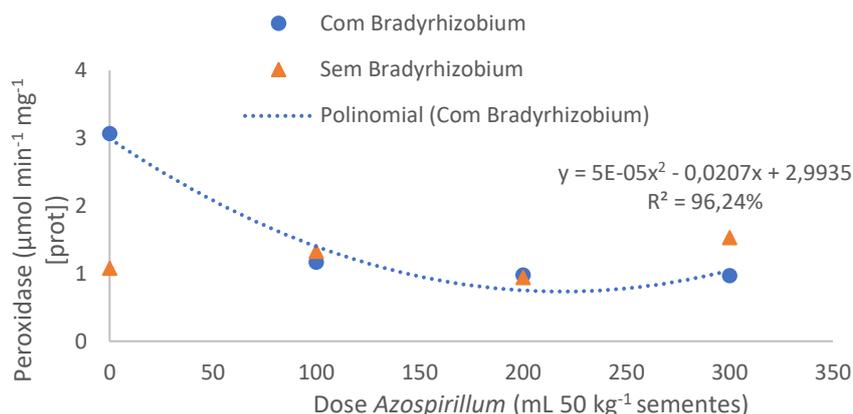
De acordo com Soares (2017), diferentes grupos de maturação de soja apresentam comportamentos fisiológicos distintos, determinando o desenvolvimento e a produtividade da cultura. Em trabalho realizado por Soares (2016), a cultivar de soja do grupo de maturação 7.1 apresentou maior atividade da POD comparadas a cultivares de grupo de maturação mais longos. Soares (2017), estudando os resultados do metabolismo oxidativo em plantas de soja, observou que os cultivares e os tratamentos com bioestimulantes causaram efeito na atividade da POD.

**TABELA 21.** Média da atividade de Peroxidase (POD) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

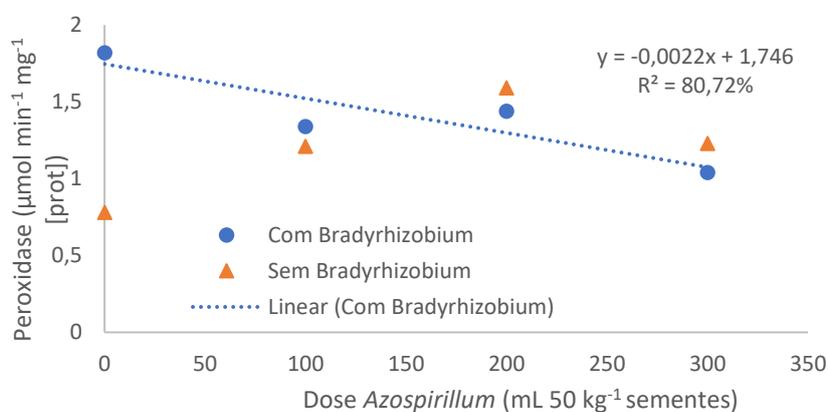
| POD ( $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ [proteína]) |                            |        |                            |        |
|--|----------------------------|--------|----------------------------|--------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V3                         |        | V6                         |        |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                        | Sem    | Com                        | Sem    |
| 0  | 3,07 A*                    | 1,08 B | 1,82 A                     | 0,78 B |
| 100  | 1,17 A                     | 1,33 A | 1,34 A                     | 1,21 A |
| 200  | 0,98 A                     | 0,94 A | 1,44 A                     | 1,59 A |
| 300  | 0,97 A                     | 1,53 A | 1,04 A                     | 1,22 A |
| <b>Média</b>   | -                          | -      | -                          | -      |
| <b>Testemunha</b>  | 1,44                       |        | 1,24                       |        |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>3,014; 0,955; 3,309</b> |        | <b>2,474; 0,930; 0,291</b> |        |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                         |        | R5                         |        |
|  |                            |        |                            |        |
|  |                            |        |                            |        |
| 0  | 1,28                       | 1,13*  | 1,61                       | 1,26   |
| 100  | 1,32                       | 1,28   | 1,74                       | 1,63   |
| 200  | 1,35                       | 1,48   | 1,44                       | 2,19   |
| 300  | 0,94*                      | 1,14*  | 1,02                       | 1,43   |
| <b>Média</b>   | 1,22 A                     | 1,26 A | 1,45 A                     | 1,63 A |
| <b>Testemunha</b>  | 2,05                       |        | 1,89                       |        |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>3,585; 0,957; 2,689</b> |        | <b>1,726; 0,945; 0,243</b> |        |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Apresentaram ajuste significativo as doses de *A. brasilense* utilizando modelo polinomial de segundo grau para a atividade de POD das plantas no estágio V3 e modelo linear no estágio V6. A equação polinomial demonstra que a menor atividade de POD, 0,8511  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  [proteína], foi alcançada com a dose de 207 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum* (Figura 21). A equação linear demonstra que a atividade de POD em plantas decresceu linearmente 0,0022  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  [proteína] a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* com inoculação de *B. japonicum*, respectivamente (Figura 22).



**FIGURA 21.** Média da atividade de POD de plantas de soja no estágio V3, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 22.** Média da atividade de POD de plantas de soja no estágio V6, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.10 Peroxidação Lipídica (PL)

A peroxidação de lipídios de membrana é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, porque causa a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998)

Analisando os dados médios da atividade de PL, no estágio V3, nenhuma diferença foi observada. Nos demais estádios, todos os tratamentos apresentaram menor atividade de PL comparados à testemunha, demonstrando que esta sofreu mais perdas devido à presença de radicais livres (Tabela 22). Mais uma vez pode-se supor haver atuação do fertilizante organomineral na proteção das plantas ao estresse. Silva (2017), em seu trabalho sobre fertilizante organomineral em soja, concluiu que a aplicação de

fertilizantes organominerais proporcionaram alterações quantitativas na atividade de peroxidação lipídica.

**TABELA 22.** Média da atividade de Peroxidação Lipídica (PL) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| PL ( $\eta$ mol [TBARS] g <sup>-1</sup> [MF])              |                            |          |                            |          |
|--|----------------------------|----------|----------------------------|----------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V3                         |          | V6                         |          |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |          | <i>Bradyrhizobium</i>      |          |
|  | Com                        | Sem      | Com                        | Sem      |
| <b>0</b>   | 72,20                      | 67,79    | 33,59*                     | 32,49*   |
| <b>100</b>   | 76,34                      | 69,48    | 33,52*                     | 34,92*   |
| <b>200</b>   | 69,28                      | 67,72    | 37,27*                     | 31,32*   |
| <b>300</b>   | 66,40                      | 61,84    | 32,38*                     | 38,90*   |
| <b>Média</b>   | 71,05 A                    | 66,71 A  | 34,19 A                    | 34,41 A  |
| <b>Testemunha</b>  | 61,80                      |          | 52,88                      |          |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>1,687; 0,973; 0,497</b> |          | <b>1,019; 0,939; 0,045</b> |          |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                         |          | R5                         |          |
|  | Com                        | Sem      | Com                        | Sem      |
| <b>0</b>   | 37,52 A*                   | 39,99 A* | 39,30 B*                   | 43,44 A* |
| <b>100</b>   | 33,18 A*                   | 37,52 A* | 35,74 A*                   | 29,97 B* |
| <b>200</b>   | 32,10 B*                   | 41,47 A* | 35,55 B*                   | 42,63 A* |
| <b>300</b>   | 29,87 A*                   | 32,38 A* | 26,99 B*                   | 31,45 A* |
| <b>Média</b>   | -                          | -        | -                          | -        |
| <b>Testemunha</b>  | 54,97                      |          | 47,20                      |          |
| <b><sup>2</sup> F; W; F'</b>                               | <b>0,775; 0,984; 0,080</b> |          | <b>1,113; 0,982; 1,527</b> |          |

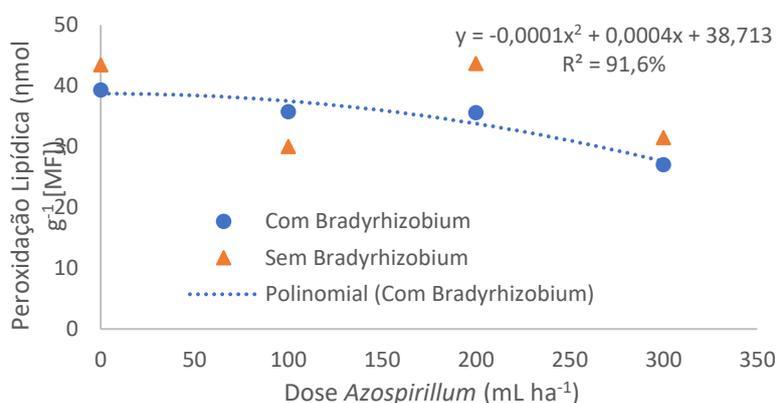
<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Müller (2016) verificou uma maior atividade da SOD e POD quando ocorreu a aplicação de *A. brasilense* em milho, o que reduziu a peroxidação de lipídios e aumentou a área foliar dos híbridos avaliados.

No trabalho realizado por Soares (2016), a cultivar de soja do grupo de maturação 7.1 apresentou maior atividade da POD, superior teor de prolina na folha e, mesmo assim, não foi suficiente para promover menor nível de peroxidação lipídica. A cultivar utilizada no presente estudo pertence ao grupo de maturação 6,8, ainda mais precoce que a cultivar relatada no trabalho de Soares (2016), podendo, portanto, a cultivar AS 3680 IPRO ser mais sensível a adversidades. Soares (2017), estudando os resultados do metabolismo oxidativo em plantas de soja, observou que os cultivares e os tratamentos com bioestimulantes causaram efeito na atividade de peroxidação lipídica.

Nonato (2016) chegou à conclusão de que a inoculação do *A. brasilense* em plantas de soja, associadas ou não a reguladores vegetais, minimiza os danos causados à parede das células pela atividade da peroxidação de lipídios.

As doses de *A. brasilense*, para a variável PL, apresentou ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau no estágio R5. A equação polinomial demonstra que a maior atividade de PL, 38,7134  $\eta\text{mol [TBARS] g}^{-1} [\text{MF}]$ , foi alcançada com a dose de 207 mL de *A. brasilense* 50  $\text{kg}^{-1}$  de sementes, com a inoculação de *B. japonicum* (Figura 23).



**FIGURA 23.** Média da atividade de PL de plantas de soja no estágio R5, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.11 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma EROs moderadamente reativa de tamanho reduzido, o que permite atravessar membranas celulares, migrando por diferentes compartimentos. Ele também atua como um mensageiro da condição de estresse. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem uma ação deletéria, participando da reação formadora de OH•, o oxidante mais reativo na família das EROs (GADJEV et al., 2008; KARUPPANAPANDIAN et al, 2011).

Esta espécie reativa não apresentou diferença significativa em V3 comparado à testemunha, com exceção ao tratamento de 100 mL de *A. brasilense* 50  $\text{kg}^{-1}$  de sementes, sem a presença de *B. japonicum*, que apresentou maior atividade. Em V6, os tratamentos com apenas *B. japonicum* e com apenas *A. brasilense* na dose de 200 mL 50  $\text{kg}^{-1}$  de sementes apresentaram maior atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado à testemunha, sendo que os demais tratamentos apresentaram menores atividades desta espécie reativa.

Nos demais estádios avaliados, R2 e R6, todos os tratamentos apresentaram menor atividade para esta variável em relação à testemunha, à semelhança do que ocorreu a peroxidação lipídica nos estádios V6, R2 e R6 (Tabela 23). Além da atuação do fertilizante organomineral, outras enzimas antioxidantes não avaliadas podem ter sido

ativadas, como ascorbato, peroxidase e as enzimas do grupo glutationas. Tal fato explicaria o aumento dos teores de PTS e redução de PL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

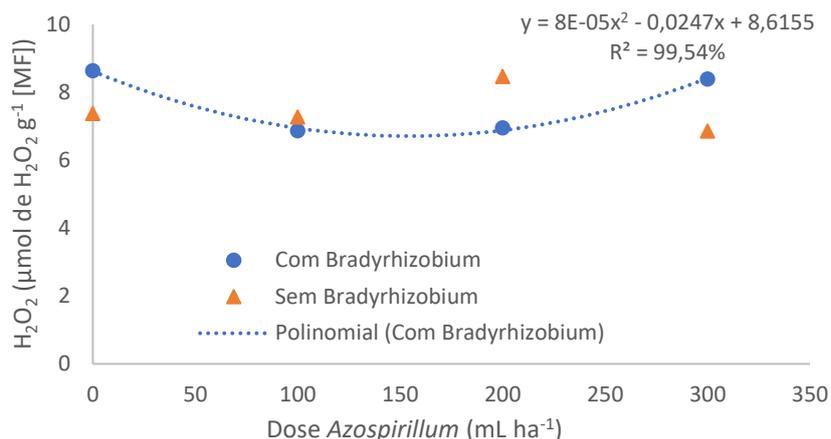
Em seus estudos com grupos de maturação de soja, Soares (2016) relatou resultados divergentes aos encontrados no presente trabalho, pois a cultivar de menor grupo de maturação (6,1) obteve menor atividade da enzima SOD e houve um aumento no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, supondo que a atividade da SOD aumentou as reações de transformação de espécies reativas de oxigênio (O<sub>2</sub>-), pois segundo Gill e Tuteja (2010), esta enzima faz a dismutação do O<sub>2</sub>- em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O.

**TABELA 23.** Média da atividade do Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol g <sup>-1</sup> [MF])  |                            |         |                            |         |
|--|----------------------------|---------|----------------------------|---------|
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | V3                         |         | V6                         |         |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     |
| 0  | 6,07 A                     | 7,50 A  | 8,64                       | 7,38*   |
| 100  | 5,76 B                     | 8,98 A* | 6,87*                      | 7,27*   |
| 200  | 4,72 A                     | 5,19 A  | 6,95*                      | 8,47    |
| 300  | 6,10 A                     | 5,10 A  | 8,39                       | 6,86*   |
| Média  | -                          | -       | 7,72 A                     | 7,49 A  |
| Testemunha   | 5,96                       |         | 10,55                      |         |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>0,682; 0,974; 0,207</b> |         | <b>1,483; 0,985; 3,948</b> |         |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                         |         | R5                         |         |
| 0  | 8,33*                      | 6,26*   | 8,45 A*                    | 8,23 A* |
| 100  | 7,14*                      | 6,12*   | 6,76 A*                    | 7,57 A* |
| 200  | 6,93*                      | 7,89*   | 7,09 A*                    | 7,84 A* |
| 300  | 8,68*                      | 7,81*   | 9,70 A*                    | 6,85 B* |
| Média  | 7,77 A                     | 7,02 A  | -                          | -       |
| Testemunha   | 11,86                      |         | 11,46                      |         |
| <sup>2</sup> F; W; F'                                      | <b>1,647; 0,967; 3,910</b> |         | <b>2,576; 0,971; 1,796</b> |         |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

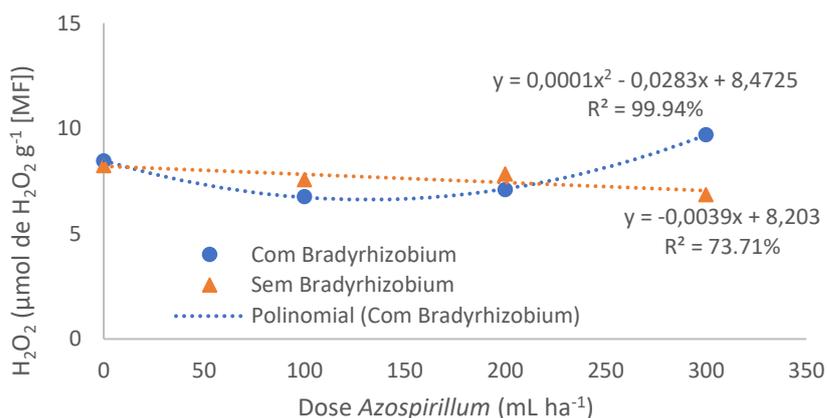
Apresentaram ajuste significativo as doses de *A. brasilense* utilizando modelo polinomial de segundo grau para a atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das plantas no estádio V6 e R5. As equações polinomiais demonstram que a menor atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6,7089 e 6,4703 μmol g<sup>-1</sup> [MF] foram alcançadas com as doses de 154,38 e 141,5 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum* (Figuras 24 e 25). Doses acima das mencionadas aumentaram a atividade dessa espécie de oxigênio reativo, tendo sido prejudicial às plantas nas condições do experimento.



**FIGURA 24.** Média da atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de plantas de soja, no estágio V6, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

Modelo linear foi encontrado para as doses de *A. brasilense* no estágio R5 quando não foi aplicado *B. japonicum*. A equação linear demonstra que a atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas decresceu linearmente 0,0039 μmol g<sup>-1</sup> [MF] a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense*, o que representa uma maior neutralização desta espécie reativa (Figura 24).

Diferentemente, Teixeira (2016) verificou que as variáveis CAT, POD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e PL apresentaram acréscimo linear quando submetidas ao aumento de doses de cisteína, o que representa que a atividade dessas enzimas, apesar de apresentar incrementos, não foram suficientes para reduzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, a PL.



**FIGURA 25.** Média da atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de plantas de soja, no estágio R5, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.12 Prolina (PROL)

A prolina é um antioxidante não enzimático que também desempenha um papel importante na desintoxicação de EROs (AHMAD et al., 2010). Ela contribui com membranas de estabilização e estruturas subcelulares, além de proteger as funções celulares (KAUR; ASTHIR, 2015), podendo ser produzida no citosol e nos cloroplastos (REJEB et al., 2014).

Alguns trabalhos têm mostrado que a PROL pode atuar como uma molécula sinalizadora, podendo induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes em resposta a diferentes tipos de estresse (CARVALHO et al., 2013; REJEB et al., 2014).

Pode-se observar que, no estágio V3, os tratamentos com *B. japonicum* apresentaram maiores teores de PROL em relação à testemunha, com exceção ao tratamento coinoculado com 300 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, podendo este micro-organismo, em sua maior dose, ter protegido a planta do estresse da inoculação com *B. japonicum*. Em V6 e R2, não foram observadas diferenças estatísticas em comparação à testemunha. No estágio R5, à semelhança de V3, pode-se verificar maiores teores de PROL nos tratamentos com *B. japonicum*, isolado ou em coinoculação com 100 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes comparados à testemunha (Tabela 24).

Drews (2016), baseado em resultados de experimento de coinoculação em soja, afirma não ter encontrado efeito da inoculação mista de *B. japonicum* e *A. brasilense* na síntese de prolina.

Soares (2017), estudando a caracterização fisiológica de grupos de maturação da soja submetida à aplicação de bioestimulante, verificou que a cultivar AS 3610 IPRO (grupo 6,1) apresentou o maior teor de PROL, com incremento médio de 163,17% em relação às demais cultivares, e sugere que essa cultivar de menor grau de maturação tenha utilizado o metabolismo não-enzimático para se proteger de danos.

Gonçalves (2017) relatou que, em sua pesquisa, foi possível observar um aumento do teor de prolina com o incremento do estresse hídrico, sendo que, na condição de estresse mais severo (-0,5 MPa), verificou-se maior conteúdo de prolina para as duas cultivares estudadas. Teixeira (2016), testando aminoácidos em soja, relatou que o teor de PROL foi mais evidenciado a partir da aplicação de 9,9 mg [glicina] kg<sup>-1</sup> semente,

obtendo incremento de 31% e a cisteína (3 mg kg<sup>-1</sup> semente) promoveu incremento de 80%, ambos em relação ao controle.

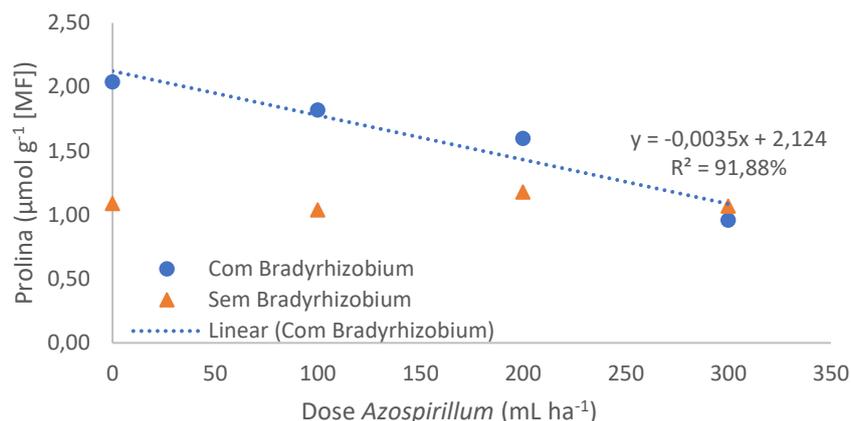
**TABELA 24.** Média da atividade de Prolina (PROL) de plantas de soja nos estádios V3, V6, R2 e R5 submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | PROL (μmol g <sup>-1</sup> [MF]) |        |                            |        |
|--|----------------------------------|--------|----------------------------|--------|
|  | V3                               |        | V6                         |        |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>            |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                              | Sem    | Com                        | Sem    |
| 0  | 2,04 A*                          | 1,09 B | 0,56                       | 0,7    |
| 100  | 1,82 A*                          | 1,04 B | 0,53                       | 0,59   |
| 200  | 1,60 A*                          | 1,18 A | 0,61                       | 0,76   |
| 300  | 0,96 A                           | 1,07 A | 0,68                       | 0,67   |
| <b>Média</b>   | -                                | -      | 0,60 A                     | 0,68 A |
| <b>Testemunha</b>  | 0,47                             |        | 0,61                       |        |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>1,778; 0,955; 0,438</b>       |        | <b>1,915; 0,943; 0,012</b> |        |
| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | R2                               |        | R5                         |        |
|  | <i>Bradyrhizobium</i>            |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |        |
|  | Com                              | Sem    | Com                        | Sem    |
| 0  | 1,20 A                           | 0,45 B | 0,63 A*                    | 0,13 B |
| 100  | 0,94 A                           | 0,47 A | 0,48 A*                    | 0,14 B |
| 200  | 0,62 A                           | 0,49 A | 0,15 A                     | 0,15 A |
| 300  | 0,76 A                           | 0,50 A | 0,14 A                     | 0,07 A |
| <b>Média</b>   | -                                | -      | -                          | -      |
| <b>Testemunha</b>  | 0,50                             |        | 0,16                       |        |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>1,601; 0,882; 3,210</b>       |        | <b>2,583; 0,801; 9,794</b> |        |

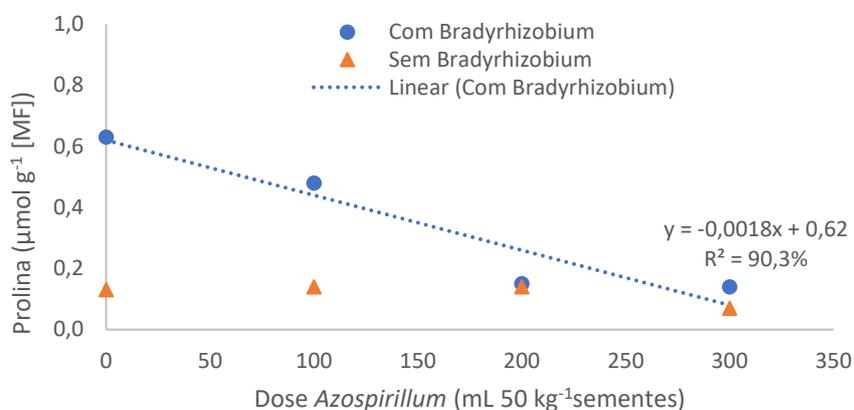
<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Vale ressaltar que um alto teor de prolina sintetizado é prejudicial às plantas, pois este antioxidante consome entre 0,4 e 0,6% do N total das folhas (ERNST et al., 2000). Ademais, podendo ocorrer o consumo de parte no N que poderia ser utilizado para o crescimento, além da inibição do crescimento devido à toxidez desses aminoácidos quando presentes em altas concentrações.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando-se modelo linear. Observou-se que a atividade de PROL em plantas decresceu linearmente 0,0035 e 0,0018 μmol g<sup>-1</sup> [MF] a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense*, com inoculação de *B. japonicum* nos estádios V3 e R5, respectivamente (Figuras 26 e 27), o que demonstra que o *A. brasilense* em doses maiores, coinoculada com *B. japonicum*, confere proteção às plantas com relação a estresses.



**FIGURA 26.** Média da atividade de PROL em plantas de soja no estágio V3, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.



**FIGURA 27.** Média da atividade de PROL em plantas de soja no estágio R5, na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

Um assunto bastante discutido entre produtores e consultores é a relação entre a sensibilidade a estresses bióticos e abióticos e as cultivares de menor ciclo, sendo essas mais sensíveis, exigindo melhores condições de ambiente para obtenção de altas produtividades. No entanto, existem poucas informações científicas que atestam tal discussão.

Contudo, as informações existentes, ainda que poucas, mostram que cada material genético apresenta um comportamento e que ainda deve ser muito bem investigado como a duração do ciclo pode interferir nos metabolismos relacionados à defesa contra estresses (SOARES, 2017). Para Müller (2016), os híbridos de milho têm comportamentos distintos com a presença da bactéria, porém esta afeta positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta o sistema radicular e a área foliar das plantas.

### 3.13 Análise Química

Na análise química foliar pode-se observar que inoculação e coinoculação apresentaram diferença apenas para boro (B). Com relação à testemunha, o tratamento com inoculação isolada de 200 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> sementes apresentou maiores teores para fósforo (P), cobre (Cu) e manganês (Mn). Este último elemento ainda apresentou maiores teores quando não foi aplicado nenhum dos dois inoculantes. Os elementos K e Mg apresentaram diferença para todos os tratamentos comparados à testemunha, sendo K maiores teores e Mg menores (Tabela 25).

Nonato (2016) afirma que a inoculação de *A. brasilense* e o uso de reguladores vegetais promoveram melhorias nos teores de nutrientes foliares em seu experimento com a cultura da soja.

**TABELA 25.** Análise química de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| <sup>1</sup> Tratamentos | Macronutrientes    |       |       |      |       |      | Micronutrientes     |        |        |        |      |
|--------------------------|--------------------|-------|-------|------|-------|------|---------------------|--------|--------|--------|------|
|                          | N                  | P     | K     | Ca   | Mg    | S    | B                   | Cu     | Fe     | Mn     | Zn   |
|                          | g kg <sup>-1</sup> |       |       |      |       |      | mg kg <sup>-1</sup> |        |        |        |      |
| <b>T1</b>                | 3,22               | 0,34* | 8,50* | 7,04 | 0,38* | 0,54 | 59,12A              | 10,02  | 240,5  | 24,82  | 5,94 |
| <b>T2</b>                | 3,36               | 0,24  | 8,50* | 7,66 | 0,38* | 0,48 | 52,61A              | 10,42  | 270,54 | 28,42  | 7,32 |
| <b>T3</b>                | 3,5                | 0,12  | 7,50* | 6,82 | 0,40* | 0,34 | 52,71A              | 10,38  | 243,72 | 27,3   | 7,11 |
| <b>T4</b>                | 3,5                | 0,12  | 7,60* | 7,04 | 0,30* | 0,42 | 54,21A              | 10,02  | 638,2  | 33,56  | 6,4  |
| <b>T5</b>                | 3,36               | 0,22  | 8,30* | 7,8  | 0,48* | 0,38 | 45,14B              | 10,38  | 530,78 | 39,32* | 6,94 |
| <b>T6</b>                | 3,92               | 0,3   | 8,00* | 6,72 | 0,22* | 0,36 | 40,68B              | 10,28  | 626,14 | 34,98  | 5,34 |
| <b>T7</b>                | 3,92               | 0,34* | 9,20* | 7,5  | 0,34* | 0,4  | 41,74B              | 10,86* | 652,54 | 39,56* | 8,26 |
| <b>T8</b>                | 3,92               | 0,26  | 8,60* | 6,92 | 0,32* | 0,42 | 40,57B              | 10,16  | 245,74 | 26,52  | 6,99 |
| <b>Testemunha</b>        | 3,78               | 0,06  | 1,2   | 7,86 | 1,86  | 0,64 | 31,88               | 9,82   | 151,96 | 14,8   | 7,93 |
| <b>Transformação</b>     | -                  | -     | -     | -    | √x    | -    | -                   | -      | -      | -      | -    |

<sup>1</sup>T1 - Com *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T2 - Com *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T3 - Com *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T4 - Com *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*; T5 - Sem *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T6 - Sem *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T7 - Sem *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T8 - Sem *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*.<sup>2</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna (referente a *B. japonicum*) diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade.

No entanto, quando relacionamos os nutrientes com a massa seca de parte aérea, obtendo valores totais médios dos nutrientes por plantas, outras diferenças são observadas quando comparadas à testemunha. As plantas tratadas com 100 mL de *A. brasilense* 50 Kg<sup>-1</sup> sementes com *B. japonicum* apresentaram teores de nutrientes superiores para a maioria dos nutrientes, sendo que apenas Mg e Fe não diferiram dos teores apresentados pelas plantas testemunhas (Tabela 26).

Em trabalho de Fachinelli (2018), o Mg apresentou maiores valores quando a cultura foi adubada com N ou inoculado com *Bradyrhizobium*. O Fe apresentou o maior valor sob a inoculação com *Azospirillum* em cultura antecessora e coinoculação na cultura da soja.

**TABELA 26.** Análise química relacionada à massa seca de parte aérea de plantas de soja submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| <sup>1</sup> Tratamentos | Macronutrientes             |        |        |        |         |        | Micronutrientes              |        |       |        |        |
|--------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|------------------------------|--------|-------|--------|--------|
|                          | N                           | P      | K      | Ca     | Mg      | S      | B                            | Cu     | Fe    | Mn     | Zn     |
|                          | (g totais média por planta) |        |        |        |         |        | (mg totais média por planta) |        |       |        |        |
| T1                       | 0,01*                       | 0,150* | 0,024* | 0,020* | 0,0009  | 0,209* | 0,162*                       | 0,029* | 0,623 | 0,067  | 0,015  |
| T2                       | 0,01*                       | 0,144* | 0,026* | 0,023* | 0,0012  | 0,206* | 0,162*                       | 0,031* | 0,841 | 0,085* | 0,022* |
| T3                       | 0,012*                      | 0,112  | 0,025* | 0,023* | 0,0014  | 0,19   | 0,163*                       | 0,035* | 0,679 | 0,085* | 0,023* |
| T4                       | 0,011*                      | 0,096  | 0,024* | 0,022* | 0,0009  | 0,201  | 0,156*                       | 0,031* | 1,691 | 0,098* | 0,02   |
| T5                       | 0,011*                      | 0,137* | 0,026* | 0,024* | 0,0013  | 0,191  | 0,132*                       | 0,032* | 1,26  | 0,107* | 0,02   |
| T6                       | 0,012*                      | 0,166* | 0,025* | 0,021* | 0,0006* | 0,188  | 0,121                        | 0,032* | 1,567 | 0,100* | 0,016  |
| T7                       | 0,012*                      | 0,169* | 0,027* | 0,022* | 0,001   | 0,196  | 0,128*                       | 0,032* | 1,94  | 0,118* | 0,025* |
| T8                       | 0,011*                      | 0,136* | 0,025* | 0,02*  | 0,0009  | 0,197  | 0,118*                       | 0,029* | 0,651 | 0,074* | 0,019  |
| <b>Testemunha</b>        | 0,004                       | 0,035  | 0,001  | 0,009  | 0,002   | 0,148  | 0,035                        | 0,011  | 0,162 | 0,016  | 0,009  |
| <b>Transformação</b>     | Arco sen $\sqrt{x}$         |        |        |        |         |        | Arco sen $\sqrt{x}$          |        |       |        |        |

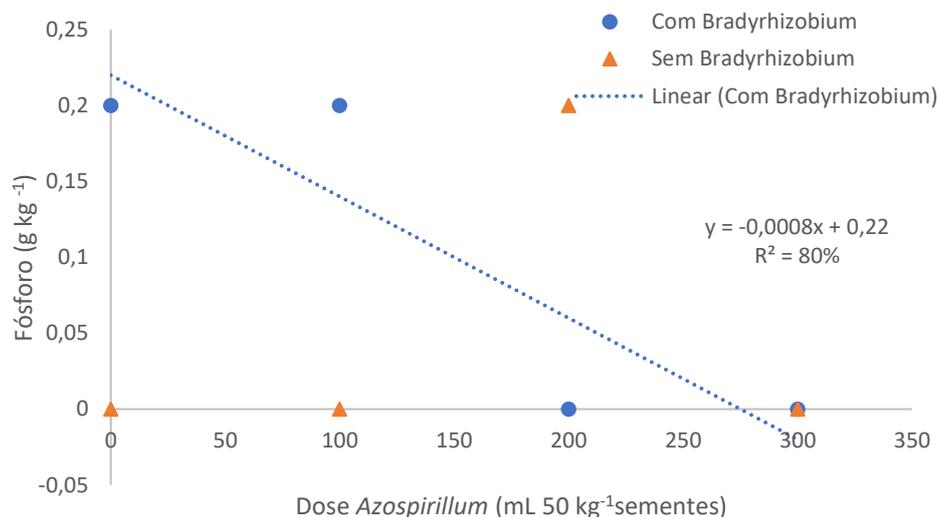
<sup>1</sup>T1 - Com *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T2 - Com *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T3 - Com *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T4 - Com *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*; T5 - Sem *B. japonicum* + 0 *A. brasilense*; T6 - Sem *B. japonicum* + 100 mL *A. brasilense*; T7 - Sem *B. japonicum* + 200 mL *A. brasilense*; T8 - Sem *B. japonicum* + 300 mL *A. brasilense*.<sup>2</sup> Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna (referente a *B. japonicum*) diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade.

Uma grande quantidade de nutrientes é encontrada em resíduos culturais. A disponibilidade destes para as culturas instaladas pode ser rápida e intensa ou lenta e gradativa. Fatores como temperatura, precipitação pluviométrica, macro e microbiologia do solo influenciam de forma contundente a ciclagem dos nutrientes (TEIXEIRA, 2010; TEIXEIRA et al., 2012). A relação Carbono/Nitrogênio é outro fator primordial para a determinação da velocidade da liberação dos nutrientes ao solo, quanto maior a relação C/N, mais recalcitrante é o material, ou seja, mais difícil é sua degradação (BAYER et al., 2006).

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram a quantidade de nutrientes presente nos restos culturais e que formarão uma base para ciclagem e reincorporação de nutrientes, proporcionando benefícios às culturas seguintes. Alvarenga et al. (2001) mencionam que as leguminosas comumente apresentam palha com baixa relação C/N, o que favorece a rápida decomposição. Portanto, os nutrientes contidos na massa seca da

parte aérea, que fica em campo como resto cultural, se torna fonte rápida de nutrientes para a cultura subsequente.

As doses de *A. brasilense* apresentaram ajuste significativo utilizando-se modelo linear. Observou-se que o teor de P nas plantas decresceu linearmente 0,0008 g kg<sup>-1</sup> a cada 1 mL acrescido nas doses de *A. brasilense* com inoculação de *B. japonicum* (Figura 28).



**FIGURA 28.** Média do teor de P em plantas de soja na maturação fisiológica na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

### 3.14 Indicadores de Produtividade

As variáveis massa de grãos (MG) e número médio de grãos por planta (NMGP) não apresentaram diferença entre inoculação ou não de *B. japonicum*, mas apresentaram diferença significativa com relação à testemunha, obtendo maiores valores para MS e NMGP (Tabela 27). Essa diferença se deve provavelmente devido à aplicação de fertilizante, ausente na testemunha. Resultados semelhantes foram relatados por Flauzino et al. (2018), cuja variável massa de cem grãos não foi influenciada pela inoculação das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*.

Já Finoto et al. (2017) afirmaram que os tratamentos contendo 3 vezes ou mais a dose recomendada de inoculante (*B. japonicum*) proporcionaram maiores produtividades de grãos independente da coinoculação.

**TABELA 27.** Massa de grãos (MG) e número médio de grãos por planta (NMGP), de plantas submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose <i>Azospirillum</i> (mL 50 kg <sup>-1</sup> sementes) | MG (g)                     |        | NMGP                       |         |
|--|----------------------------|--------|----------------------------|---------|
|  | <i>Bradyrhizobium</i>      |        | <i>Bradyrhizobium</i>      |         |
|  | Com                        | Sem    | Com                        | Sem     |
| 0  | 7,09*                      | 7,58*  | 61,37*                     | 59,62*  |
| 100  | 7,55*                      | 7,6*   | 57,47*                     | 59,64*  |
| 200  | 8,48*                      | 7,61*  | 68,30*                     | 57,39*  |
| 300  | 7,56*                      | 7,47*  | 58,82*                     | 59,53*  |
| <b>Média</b>   | 7,67 A                     | 7,56 A | 61,49 A                    | 59,04 A |
| <b>Testemunha</b>  | 3,76                       |        | 28,91                      |         |
| <sup>2</sup> <b>F; W; F'</b>                               | <b>1,402; 0,965; 1,158</b> |        | <b>2,072; 0,879; 3,040</b> |         |

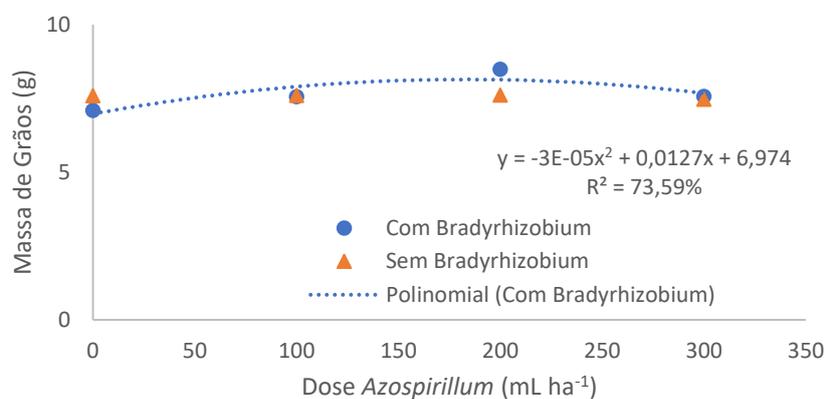
<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Em contrapartida, Galindo et al. (2018), estudando a viabilidade técnica e econômica da coinoculação com *A. brasilense* em cultivares de soja, observaram que a interação entre cultivares e inoculação foi significativa para o número de vagens por planta e massa de 100 grãos. Sendo que, para massa de 100 grãos, o cultivar 'Valiosa' apresentou maiores valores com e sem coinoculação com *A. brasilense* comparada a cultivar 'Potência'. No entanto, ambas as cultivares apresentaram maior peso de 100 grãos quando realizada a coinoculação.

Rengel et al. (2018) encontraram resultados que demonstram que o número de grãos por vagem e a produtividade com a coinoculação foi superior à inoculação, independente da forma de aplicação dos inoculantes (semente ou sulco), sendo que a fonte de *Bradyrhizobium* utilizada no trabalho é uma combinação de duas estirpes (*B. japonicum* e *B. ekanii*).

Bárbaro-Toerneli et al. (2018) avaliando cultivares de soja no estado de São Paulo em resposta à aplicação de inoculantes afirmaram que a prática de coinoculação em soja (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) no sulco de semeadura proporcionou a melhor resposta quanto à massa de mil grãos e produtividade. Nesta linha, Braccini et al. (2016) observaram que a coinoculação de *B. japonicum* com *A. brasilense* via sulco de semeadura pode garantir uma maior população de bactérias no momento da germinação, favorecendo a FBN mais rapidamente e, conseqüentemente, maiores rendimentos na soja.

As doses de *A. brasilense* para a variável MG apresentou ajuste significativo utilizando modelo polinomial de segundo grau. A equação polinomial demonstra que a maior MS, 8,3181 (g) foi alcançada com a dose de 211,6667 mL de *A. brasilense* 50 kg<sup>-1</sup> de sementes, com a inoculação de *B. japonicum*; doses superiores promovem um decréscimo da massa de grãos (Figura 29).



**FIGURA 29.** Massa de grãos de plantas de soja na presença de *A. brasilense*, com e sem inoculação de *B. japonicum*. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

A classificação de sementes por peneiras não apresentou diferença significativa, nem mesmo em comparação à testemunha (Tabela 28).

**TABELA 28.** Classificação em peneiras de 6,5; 6; 5,5; 5 e 4,4 mm, do número médio de sementes de plantas submetidas a diferentes doses de *A. brasilense*, com presença e ausência de *B. japonicum* em relação à ausência de inoculante e fertilizante organomineral. UFU, Uberlândia-MG. 2019.

| Dose<br><i>Azospirillum</i><br>(mL 50 kg <sup>-1</sup><br>sementes) | Peneira 6,5 mm             |         | Peneira 6 mm               |         | Peneira 5,5 mm             |         | Peneira 5 mm               |        | Peneira 4,5 mm              |        |
|---|----------------------------|---------|----------------------------|---------|----------------------------|---------|----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
|   | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |         | <i>Bradyrhizobium</i>      |        | <i>Bradyrhizobium</i>       |        |
|   | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     | Com                        | Sem     | Com                        | Sem    | Com                         | Sem    |
| 0   | 22,61                      | 33,51   | 19,85                      | 21,19   | 33,51                      | 32,6    | 11,89                      | 9,44   | 5,96                        | 2,25   |
| 100   | 41,14                      | 35,05   | 21,05                      | 22,8    | 26,3                       | 31,02   | 8,71                       | 8,83   | 1,41                        | 1,23   |
| 200   | 31,66                      | 39,66   | 22,05                      | 20,99   | 33,88                      | 27,87   | 9,44                       | 8,2    | 1,96                        | 2,95   |
| 300   | 33,61                      | 31,48   | 24,27                      | 19,56   | 33,17                      | 30,98   | 9,05                       | 9,4    | 0,89                        | 1,66   |
| <b>Média</b>  | 32,26 A                    | 34,92 A | 21,81 A                    | 21,14 A | 31,71 A                    | 30,62 A | 9,77 A                     | 8,97 A | 2,55 A                      | 2,02 A |
| <b>Testemunha</b>   | 27,94                      |         | 25,1                       |         | 32,61                      |         | 9,95                       |        | 2,21                        |        |
| <sup>2</sup> F; W; F'   | <b>1,518; 0,945; 0,002</b> |         | <b>2,151; 0,981; 0,104</b> |         | <b>1,267; 0,984; 0,992</b> |         | <b>0,929; 0,932; 0,551</b> |        | <b>2,271; 0,833; 34,709</b> |        |

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey; médias acompanhadas de asterisco diferem da testemunha pelo teste de Dunnett; ambos a 0,05 de probabilidade; <sup>2</sup> F; W; F': valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos com distribuição normal e aditividade entre blocos e tratamentos pelos teste de Levene, Shapiro-Wilk e Tukey para não aditividade, respectivamente, todos a 0,01 de probabilidade.

Mattioni et al. (2011) avaliando a variabilidade espacial da produtividade e da qualidade das sementes de soja observaram uma variabilidade alta na produção de sementes maiores e menores nos campos de produção de sementes, sendo as sementes de tamanho médio pouco afetadas por variação. Estes mesmos autores ainda enfatizam a importância da seleção das peneiras quanto ao tamanho da perfuração para cada cultivar,

pois, apesar do tamanho da semente ser determinado pelo genótipo, é também influenciado pelas condições climáticas prevaletentes durante o desenvolvimento.

Santos et al. (2005) afirmaram que o tamanho das sementes influencia a sua qualidade fisiológica durante o armazenamento. Barbosa et al. (2010), que também estudaram qualidade de sementes, relatam que as maiores porcentagens de germinação e vigor pelo teste de condutividade elétrica das sementes de soja da cultivar BRS Tracajá, durante o armazenamento, foram obtidas nas sementes de maiores tamanhos (6,0 e 6,5 mm), e que essas apresentaram, durante o armazenamento, a maior porcentagem de emergência de plântula em campo, enquanto que as sementes de menores tamanhos (5,5 mm) apontaram os menores índices de velocidade de emergência de plântula em campo.

De modo geral, os resultados com relação à coinoculação em soja têm se mostrado inconclusivos, podendo apresentar resultados contraditórios, estimulando ou inibindo a produção de nódulos e o crescimento das raízes em um sistema simbiótico, em função do nível de concentração do inóculo e do tipo de inoculação (FERLINI, 2006). Ademais, sabe-se que fatores edafoclimáticos e de manejos da cultura podem influenciar na eficiência dos microrganismos (PEREZ, 2014), sendo este mais um fator de variação dos resultados.

A resposta das cultivares também têm se mostrado diferente. Segundo Reis et al. (2000), existem variações relacionadas à afinidade das bactérias do gênero *Azospirillum* com determinadas cultivares. Tal fato é confirmado pelos resultados de Galindo et al. (2018), em que as cultivares "Potência" e "Valiosa" apresentaram incrementos de 25,7 e 10,2% no número de vagens, e de 5,7 e 1,6% em peso de 100, respectivamente, quando coinoculadas com *A. brasilense*.

Bulegon et al. (2016b) também afirmaram ter encontrado capacidade de respostas diferentes entre as cultivares de soja BMX Turbo e Coodetec 250. Foi observado efeito dos tratamentos apenas para a cultivar Turbo, onde a testemunha apresentou menores médias e os maiores valores médios nas plantas inoculadas com *A. brasilense*.

Vale ressaltar também que os resultados podem mascarar os efeitos de tratamentos utilizados em ensaios conduzidos em casa de vegetação quando realizados em vasos. Tal fato pode ocorrer em razão das diferenças no grau de exploração das raízes das plantas confinadas no vaso em comparação à cultura no campo (COPE; EVANS, 1985), informação também relatada por Fagan et al. (2016).

## 4 CONCLUSÃO

1- A bactéria *A. brasilense*, promove proteção fisiológica às plantas contra estresse, principalmente relacionada à atividade da enzima Superóxido Dismutase.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, P.; JALEEL, C. A.; SHARMA, S. Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 57, n. 4, p. 509-517, 2010. DOI: 10.1134/S1021443710040084. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443710040084>. Acesso em: 02 dez. 2018.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v.24, p.1337-1344, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>. Acesso em: 25 out. 2018.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574p.

ALVARENGA, R.C.; CABEZAS, W.A.L.; CRUZ, J.C.; SANTANA, D.P. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 208, p. 25-36, 2001. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/485005/plantas-de-cobertura-de-solo-para-sistema-plantio-direto>. Acesso em: 17 out. 2017.

ALVES FILHO, A.; CAMARGO, R.; LANA, R. M. Q.; MORAES, M. R. B.; MALDONADO, A. C. D.; ATARASI, R. T. Treatment of sewage sludge with the use of solarization and sanitizing products for agricultural purposes. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 11, n. 3, p. 184-191, Jan., 2016. DOI: 10.5897/AJAR2015.10571. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/944e/1d3a856b6fc1318d2c2d0199b5ebcd8a57ae.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2017.

ANTILLE, D. L.; GODWIN, R. J.; SAKRABANI, R.; SENEWEERA, S.; TYRREL, S. F.; JOHNSTON, A. E. Field-scale evaluation of biosolids-derived organomineral fertilizers applied to winter wheat in England. **Agronomy Journal**, Madison, v. 109, n. 2, p. 654-674, 2017. DOI: 10.2134/agronj2016.09.0495. Disponível em: <https://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/11597>. Acesso em: 14 set. 2018.

ARAÚJO JÚNIOR, O. Soja em sucessão ao capim marandu: efeito do *Azospirillum* associado ao *Bradyrhizobium*. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2018.

- BALBINOT JUNIOR, A. A.; PROCÓPIO, S. de O.; DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C. **Densidade de plantas na cultura da soja.** (Documentos 364) Londrina: Embrapa Soja, 2015. 36 p. Disponível em: [ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133156/1/doc364.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133156/1/doc364.pdf). Acesso em: 22 ago. 2018.
- BÁRBARO, I.M.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MACHADO, P. C.; MIGUEL, F. B. Resultados preliminares da co-inoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: <http://aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2011/2011-julho-dezembro/853-resultados-preliminares-da-co-inoculacao-de-azospirillum-juntamente-com-bradyrhizobium-em-soja.html>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. In: INFOBIBOS – Informações Tecnológicas. **INFOBIBOS**. Campinas: INFOBIBOS, 2008. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm). Acesso em: 14 set. 2018.
- BÁRBARO, I.M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 01-07. 2009. DOI: 10.5747/ca.2009.v05.n1.a0040. Disponível em: <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/372/510>. Acesso em: 14 set 2018.
- BARBOSA, C. Z. dos R.; SMIDERLE, O. J.; ALVES, J. M. A; VILARINHO, A. A.; SEDIYAMA, T. Qualidade de sementes de soja BRS Tracajá, colhidas em Roraima em função do tamanho no armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 73-80, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rca/v41n1/1806-6690-rca-41-01-0073.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.
- BARTOLI, C. G.; CASALONGUE, C. A.; SIMONTACCHI, M.; MARQUEZ-GARCIA, B.; FOYER, C.H. Interactions between Hormone and Redox Signalling Pathways in the Control of Growth and Cross Tolerance to Stress. **Environmental and Experimental Botany**, n. 93, p. 73-88. 2012. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.05.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847212001165>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BASHAN, Y., BASHAN, L. E., PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998- 2013). **Plant and Soil**, Crawley, v. 378, p. 1-33, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-013-1956-x>. Acesso em: 23 abr de 2019.
- BATES, L.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, The Hague, v.39, p.205-207, 1973. DOI: 10.1007/BF00018060. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00018060>. Acesso em: 09 nov. 2018.

- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A.; DIECKOW, J. Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till. **Soil and Tillage Research**, v. 86, n. 2, p. 237-245, Apr. 2006. DOI: 10.1016/j.still.2005.02.023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167198705000723>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269771903708>. Acesso em: 22 set. 2018.
- BENITES, V. DE M.; MOUTTA, R. DE O.; COUTINHO, H. L. DA C.; BALIEIRO, F. DE C. Análise discriminante de solos sob diferentes usos em área de mata atlântica a partir de atributos da matéria orgânica. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.4, p.685-690, 2010. DOI: 10.1590/S0100-67622010000400013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622010000400013&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622010000400013&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 17 mar. 2017.
- BERG, J.; LÄSSIG, M.; WAGNER, A. Structure and evolution of protein interaction networks: a statistical model for link dynamics and gene duplications. **BMC Evolutionary Biology**, 4:51. 2004. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-51>. DOI: 10.1186/1471-2148-4-51. Disponível em: <https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-4-51>. Acesso em: 11 out. 2018.
- BRACCINI, A.L.; MARUICCI, G.E.; SUZUKAWA, A.K. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**. Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016. DOI: 10.1818/sap.v15i1.10565. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/10565>. Acesso em: 03 abr. 2017.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>. Acesso em: 22 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.23, de 31 de agosto de 2005**. Aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF: MAPA, 2005. Disponível em: [http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN\\_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd](http://www.saobernardo.sp.gov.br/documents/10181/25285/IN_23-05.pdf/4774d697-38c0-4782-92c9-9e6c065e2ccd). Acesso em 12 fev. 2017.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Limerick, v.164, p.77-84, 2003. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00338-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945202003382>. Acesso em: 04 dez. 2018.

- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 3, p. 343-349, 2016(a). DOI: 10.1590/1983-40632016v46n3a3. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-40632016000300343&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-40632016000300343&script=sci_abstract). Acesso em: 03 dez. 2018.
- BULEGON, L. G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, E. A. M. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, Chapingo, v, 34, n. 2, p. 169-176, 2016 (b). Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v34n2/2395-8030-tl-34-02-00169.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2017.
- CÂMARA, G. M. de S. Fenologia é ferramenta auxiliar de técnicas de produção. **Visão Agrícola – Planta e Ambiente**, nº5. Piracicaba, 2006. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va05-planta-e-ambiente01.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- CARVALHO, K.; CAMPOS, M. K. F.; DOMINGUES, D. S.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. **Molecular Biology Report**, New York, v.40, p.3269-3279, 2013. DOI: 10.1007/s11033-012-2402-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-012-2402-5>. Acesso em: 22 dez. 2018.
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. de F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* Promotes Early Nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1641-1649, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.610164. Disponível em: [https://file.scirp.org/pdf/AJPS\\_2015063013320647.pdf](https://file.scirp.org/pdf/AJPS_2015063013320647.pdf). Acesso em: 23 abr. de 2109.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DE SOLOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS - **CFSEMG**. Recomendações para o Uso de Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação. Viçosa, MG, 1999. p. 289-302.
- COPE, J. T.; EVANS, C. E. Soil testing. In STE-WART, B. A. *Advances in soil Science*. New York, **Springer-Verlag**, v. 1, 1985.
- DEUNER, S.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; HENRIQUE, P. de C.; GOULART, P. de F. P. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 2, p. 135-140, 2008. Disponível em: <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3291/1177>. Acesso em: 21 dez. 2018.
- DREWS, T. A. **Inoculação mista com bradyrhizobium e azospirillum em cultivares de soja sob condição normal e de déficit hídrico do solo**. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil. 1996/97**. Londrina, 1996. 164p. (EMBRAPA-Soja. Documento 96). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/busca->

de-publicacoes/-/publicacao/460297/recomendacoes-tecnicas-para-a-cultura-da-soja-na-regiao-central-do-brasil-199697. Acesso em: 28 jan. 2016.

ENDRES, V. C. Espaçamento, densidade e época de semeadura. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste (Dourados, MS). **Soja: recomendações técnicas para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso**. Dourados, 1996. p. 82-85. (Circular Técnica, 3).

ERNST, W.H.O.; NELISSEN, H.J.M.; BOOKUM, W.M.T. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. **Environmental and Experimental Botany**, Philadelphia, v.43, n.1, p.55-71, 2000. DOI: 10.1016/S0098-8472(99)00048-9.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847299000489>. Acesso em: 12 nov. 2018.

FACHINELLI, R. **Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja**. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

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 – Revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007. Disponível em:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2481/1940>. Acesso em: 14 jun. 2018.

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SOARES, L. H.; DURVAL NETO, D. **Fisiologia Vegetal: Metabolismo e nutrição mineral**. São Paulo, 2016.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Artículos Técnicos – Agricultura. 2006.

Disponível em:

[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycine\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm). Acesso: 25 ago. 2015.

FERREIRA, N. R. **Eficiência agrônômica de fertilizantes organominerais sólidos e líquidos em relação a disponibilidades de fósforo**. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, 2014.

FINOTO, E. L.; CORDEIRO JÚNIOR, 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. **Nucleus**, Ituverava, p. 9-14, 2017. (Edição Especial). DOI: 10.3738/1982.2278.2815. Disponível em:

<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/2815>. Acesso em: 15 out de 2018.

FLAUZINO, D. S.; RIBEIRO, L. M.; CECCON, G. Soja associada à inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* após cultivos de outono-inverno. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 47-53, jan./mar. 2018. Disponível em:

<https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/2001/2069>. Acesso em: 25 ago. 2018.

GADJEV, I.; STONE, J. M.; GECHEV, T. S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v.270, p.87-144, 2008. DOI: 10.1016/S1937-6448(08)01403-2. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644808014032>. Acesso em: 12 nov. 2018.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ROSA, P. A. L.; TRITAPEPE, C. A. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.22, n.1, p.51-56, 2018. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662018000100051](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662018000100051). Acesso em: 15 jan. 2019.

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

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870416>. Acesso em: 11 nov. 2018.

GITTI, D. C. Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja. *In*: MELOTTO, A. M.; LOURENÇÃO, A. L. F.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; GRIGOLLI, J. F. J. (ed.).

**Tecnologia e Produção Soja 2015/2016**. Maracaju: Fundação MS, 2016. p. 15-24. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br:8080/anuario-tecnologia-e-producao-soja-2015-2016>. Acesso em: 03 out. 2018.

GOMES, H. H. da S.; SMIDERLE, O. J.; MENEZES, P. H. S. de; GIANLUPI, V.; MARQUES, C. S. Características agronômicas na produtividade da soja em diferentes densidades de plantas. **XXX Congresso Brasileiro de Agronomia**. Fortaleza, 2017.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085363/caracteristicas-agronicas-na-productividade-da-soja-em-diferentes-densidades-de-plantas>. Acesso em: 12 mar. 2017.

GONÇALVES, C. G. **Modificações morfológicas, fisiológicas e seletividade da soja a diferentes herbicidas em resposta ao estresse hídrico**. 132f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2017.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986168906541>. Acesso em: 10 dez. 2018.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 827-831, 2001. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129254/>. Acesso em: 11 dez. 2018.

- 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. DOI: 10.1007/s00374-012-0771-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-012-0771-5>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M., Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, Maryland Heights, v. 6, p. 153-158, 1995. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80024-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0958166995800247>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, 2015. DOI: 10.1007/s10535-015-0549-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10535-015-0549-3>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v.57, p.315-319, 1976. DOI: 10.1104/pp.57.2.315. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/57/2/315>. Acesso em: 09 nov. 2018.
- KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011. Disponível em: [http://www.cropj.com/kim\\_5\\_6\\_2011\\_709\\_725.pdf](http://www.cropj.com/kim_5_6_2011_709_725.pdf). Acesso em: 10 nov. 2018.
- LIBÓRIO, P. H. da S.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; SOBRINHO, R. M.; PAULA, G. F. G. de; SILVA, C. H. A. da; ANAIDES, L.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H. Avaliação de cultivares de soja submetidas a co-inoculação. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 10, 2018. Número especial. Disponível em: <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/1309/pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- MALAVOLTA, E. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Informações Agrônomicas**, São Paulo, v. 111, n. 3, p. 10-11, 2005.
- MATTIONI, N. M.; SCHUCH, L. O. B.; VILLELA, F. A. Variabilidade espacial da produtividade e da qualidade das sementes de soja em um campo de produção. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 608-615, 2011. DOI: 10.1590/S0101-31222011000400002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222011000400002&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222011000400002&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 15 jan. 2017.
- MAURÍCIO FILHO, J.; SILVA, C. H. S.; SOUZA, J. E. B. de. Desempenho agrônomico e produtividade da cultura da soja com a coinoculação de *Bradyrhizobium e Azospirillum brasilense*. **Ipê Agronomic Journal**, Goianésia, v.2, n.2, p. 48 - 59, 2018. Disponível em: <http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/safaeg/article/view/382/290>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- MÜLLER, T. M. **Componentes de produtividade de grãos e de atividade Enzimática na cultura do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* em tratamento de sementes e Aplicação foliar**. 85f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2016.

- NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com *Azospirillum brasilense* e reguladores vegetais**. 79f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2016.
- PAVANELLI, L. E; ARAÚJO, F. F. Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais no oeste paulista. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n.1, p. 21-29, 2009. Disponível em: [www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/6783/4477](http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/6783/4477). Acesso em: 25 ago. 2016.
- PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A.M. Aluminum effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n.3, p. 137-143, 1999.
- PEREZ, A. R.; **Coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro cultivado sob duas lâminas de irrigação: produção e qualidade fisiológica de sementes**. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2014.
- QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHÃES, A. C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. **Biology Plantarum**, v.41, n.3, p.403- 413, 1998. DOI: 10.1023/A:1001802528068. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/100517>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 19, n. 2, p. 227–247, 2000. DOI: 10.1080/07352680091139213. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680091139213>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- REJEB, K. B. ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygenspecies and face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dorchester, v.80, p. 278-284, 2014. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.04.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942814001417>, Acesso em: 09 dez. 208.
- RENGEL, D. da S.; MEERT, L.; HANEL, A.; ESPINDOLA, J. de S.; BORGHI, W. A. Diferentes inoculantes e formas de inoculação e sua influência sobre os componentes de produção e teor de nitrogênio da cultura da soja. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, Campo Mourão, v. 13, n. 1, p. 46-51, 2018. Disponível em: <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/campodigital/article/view/2382/100>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 7, p. 740-748, 2013. DOI: 10.1016/j.resmic.2013.05.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250813000995>. Acesso em: 20 fev. 2017.

- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; Vívian Vieira de MEDEIROS, V. V. de; BARROS, B. G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience jornal**, Uberlândia, v. 28, p. 196 - 202, 2012. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13174>. Acesso em: 23 set. 2016.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAÚJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5. ed., rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- SANTOS, P. M. dos; REIS, M. S.; SEDIYAMA, T.; ARAÚJO, E. F.; CECON, P. R.; SANTOS, M. R. dos. Efeito da classificação por tamanho da semente de soja na sua qualidade fisiológica durante o armazenamento. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 395-402, 2005. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1398>. Acesso em: 21 ago. 2018.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005. DOI: 10.1590/S0100-879X2005000700003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2005000700003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2005000700003). Acesso em: 21 dez. 2018.
- SCANDALIOS, J.G. Oxigen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.7-12, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158641/pdf/1010007.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2018.
- SCHNEIDER, F PANIZZON, L. C.; SORDI, A.; LAJÚS, C. R.; CERICATO, A.; KLEIN, C. Eficiência agrônômica da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) submetida a coinoculação. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 72-79, 2017. DOI: 10.5380/rsa.v18i4.52047. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/52047>. Acesso em: 06 ago. 2018.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 303-312, 1993. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301778636>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- SILVA, F. C. da. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.
- SILVA, L. G. **Torta de filtro e lodo de esgoto na composição de fertilizantes organominerais para a cultura da soja**. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de química, Uberlândia, 2017.
- SILVA, MAG.; MANNIGEL, A R.; MUNIZ, A S.; PORTO, S M A.; MARCHETTI, M E.; NOLLA, A.; BERTANI, R M A. Ammonium sulphate on maize crops under no tillage. **Bragantia**, Campinas, v.71, n.1, p. 90-97, 2012. DOI: 10.1590/S0006-87052012000100014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0006-87052012000100014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052012000100014). Acesso em: 12 abr. 2017.

SOARES, J. N. **Caracterização fisiológica e responsividade de grupos de maturação da cultura da soja submetida à aplicação de bioestimulante**. 95f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

SOARES, L. H. **Alterações fisiológicas e fenométricas na cultura de soja devido ao uso de lactofen, cinetina, ácido salicílico e boro**. 2016. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

SOLANO, L.; YAMASHITA, O. M. Cultivo da soja em diferentes espaçamentos entre linhas. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 02, n. 02, p. 35-47, 2012. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/variascientiaagraria/article/view/5382/5043>. Acesso em: 22 jun. 2017.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, Maryland Heights, v. 327, p. 649-662, 2004. DOI: 10.5380/rse.v18i4.52047. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/52047>. Acesso em: 07 nov. 2018.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.693. (Trad. SANTARÉM E.R. et al.).

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00257-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945299002575>. Acesso em: 07 nov. 2018.

TEIXEIRA, M. B. **Teores de nutrientes na palhada e no solo, após o corte das plantas de milho e sorgo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

TEIXEIRA, M. B.; LOSS, A.; GERVASIO, M. P.; PIMENTEL, C. Decomposição e ciclagem de nutrientes dos resíduos de quatro plantas de cobertura do solo. **IDESIA**, Arica, v. 30, n. 1, p. 55-64, 2012. DOI: 10.4067/S0718-34292012000100007. Disponível em: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-34292012000100007](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292012000100007). Acesso em: 28 ago. 2018.

TEIXEIRA, W. F. **Avaliação do uso de aminoácidos na cultura da soja**. 159f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agricultural Supply and Demand Estimates**, 2018. Disponível em: <https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2019.

VASCONCELOS, A.C.F.; ZHANG, X.; ERVIN, KIEHL, J.C.; Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 395-402, 2009. DOI: 10.1590/S0103-90162009000300015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162009000300015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162009000300015). Acesso em: 02 dez. 2018.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

XU, K. W.; PENTTINEN, P.; CHEN, Y. X.; ZOU, L.; ZHOU, T.; ZHANG, X.; HU, C.; LIU, F. Polyphasic characterization of rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* from Panxi, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 2303–2315, 2013. DOI: 10.1007/s11274-013-1396-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-013-1396-z>. Acesso em: 29 jun. 2017.

ZUFFO, A.M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; Neto, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 87-93. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v38n1/v38n1a13.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2018.

ZUFFO, A. M.; BRUZI, A. T.; REZENDE, P. M. de; BIANCHI, M. C.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; RIBEIRO, A. B. M.; VILELA, G. L. D. Morphoagronomic and productive traits of RR® soybean due to inoculation via *Azospirillum brasilense* groove. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.13, p. 438-444. 2016. DOI: 10.5897/AJMR2015.7682. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/77E89EA57922>. Acesso em: 12 jan. 2019.