



Universidade Federal do Piauí
Campus Prof^a Cinobelina Elvas



Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Fitotecnia

**INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* EM
CULTIVARES DE SOJA SOB CONDIÇÃO NORMAL E DE DÉFICIT
HÍDRICO DO SOLO**

Tiago Augusto Drews

Bom Jesus – PI

2016

**INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* EM
CULTIVARES DE SOJA SOB CONDIÇÃO NORMAL E DE DÉFICIT
HÍDRICO DO SOLO**

Tiago Augusto Drews
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Fabiano André Petter
Co-orientador: Prof. Dra. Daniela Vieira Chaves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Agronomia-Fitotecnia da
Universidade Federal do Piauí-UFPI, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia -
Área de concentração (Produção Vegetal).

Bom Jesus - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial de Bom Jesus
Serviço de Processamento Técnico

D776i Drews, Tiago Augusto.
Inoculação mista com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em cultivares de soja sob condição normal e de déficit hídrico do solo. / Tiago Augusto Drews. – 2016.
49 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Programa de Pós-graduação em Agronomia-Fitotecnia(Produção vegetal), Bom Jesus-PI, 2016.

Orientação: “Prof. Dr. Fabiano André Petter”.

1. Glycine max. 2. Co-inoculação. 3. Fisiologia.
4. Condição hídrica. I. Título.

CDD 633.34

**INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* EM
CULTIVARES DE SOJA SOB CONDIÇÃO NORMAL E DE DÉFICIT
HÍDRICO NO SOLO**

por

Tiago Augusto Drews

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA Área de Concentração (Fitotecnia)

Aprovada em: 22/11/2016



Dr. Fabiano Andre Petter (Orientador)
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT



Dra. Larissa Borges De Lima (Examinadora)
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT



Dr. Márcio Roggia Zanuzo (Examinador)
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por estar sempre junto a mim, nas decisões e nas conquistas, me dando sabedoria para que eu alcançasse meus objetivos.

À Maristela, minha esposa, mas acima de tudo, companheira e amiga, sempre ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, agradeço pela ajuda, compreensão e incentivo.

Agradeço de forma especial ao professor orientador Fabiano André Petter, pelas conversas que tivemos, pelas dúvidas esclarecidas, sugestões, correções, dicas, conhecimentos passados e principalmente pela amizade.

A co-orientadora professora Daniela Chaves pela ajuda, disponibilidade, sempre auxiliando de forma prestativa em todas as vezes que precisei.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Biociências e Fitotecnia. Àqueles que sempre se dispuseram a ajudar, independente da atividade, do horário e dia da semana, de forma especial ao Daniel, Daliani, Robson, Cloves, Augusto e Rogério.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia que foram indispensáveis para o meu crescimento profissional e intelectual.

A empresa Plantec Agrícola Comércio e Representação Ltda pelo incentivo e por ter cedido todos os produtos fitossanitários para a condução experimento.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Tiago Augusto Drews, filho de Albino Drews e Nilva Drews, nascido em 25 de Fevereiro de 1986, natural de Ajuricaba – RS. Em 2005 entrou no Exército Brasileiro, no 27ª GAC – Ijuí – RS, permanecendo até 28 de fevereiro de 2009, neste período concluiu o ensino médio. Em Agosto de 2009 iniciou o curso de Engenharia Agrônômica no Campus Profª Cinobelina Elvas – UFPI e concluiu em Fevereiro de 2013. Na graduação participou do grupo de pesquisa Produção Vegetal na Microrregião do Alto Médio Gurguéia – PROMAG. Desenvolveu um trabalho de extensão e quatro trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de manejo e produção de grandes culturas (algodão, soja e milho) resultando em resumos e sua monografia de conclusão de curso intitulado “Desempenho agrônômico do algodoeiro a doses e épocas de aplicação de potássio no cerrado piauiense”. Em Julho de 2014, na mesma instituição, iniciou o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia (PPGFitotecnia) concluindo o curso em Novembro de 2016.

SUMÁRIO

Resumo Geral.....	i
General Abstract.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
Capítulo I - Inoculação mista com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i> na soja: desempenho agrônômico e nodulação.....	7
Resumo.....	7
Abstract.....	8
1. Introdução.....	9
2. Material e Métodos.....	11
2.1 Local de estudo.....	11
2.2 Delineamento experimental.....	12
2.3 Variáveis estudadas.....	12
2.4 Análise estatística.....	13
3. Resultado e Discussão.....	14
4. Conclusões.....	23
5. Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo II - Respostas fisiológicas da soja à inoculação mista com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i>.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
1. Introdução.....	30
2. Material e Métodos.....	32
2.1 Local de estudo.....	32
2.2 Delineamento experimental.....	33
2.3 Variáveis fisiológicas avaliadas.....	33
2.4 Análise estatística.....	35
3. Resultados e Discussão.....	36
4. Conclusões.....	46
5. Referências Bibliográficas.....	47

INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* EM CULTIVARES DE SOJA SOB CONDIÇÃO NORMAL E DE DÉFICIT HÍDRICO DO SOLO

RESUMO GERAL

O uso de *Azospirillum brasilense* tem sido utilizado em conjunto com *Bradyrhizobium* a fim de melhorar o desenvolvimento agrônomo das plantas e proporcionar maior tolerância a estresses ambientais. Neste sentido, o presente trabalho desenvolvido no Campus Prof^ª Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, localizado no município de Bom Jesus, na safra 2015/2016 teve os seguintes objetivos: i) avaliar o efeito da inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense* via semente no desempenho agrônomo e nodulação em cultivares de soja sob condição normal e de déficit hídrico em solo do cerrado piauiense; ii) avaliar as respostas fisiológicas da soja e o suprimento de nitrogênio em função da inoculação mista de *B. japonicum* com *A. brasilense* via semente, em condição normal e de déficit hídrico do solo. Foram avaliados os parâmetros morfofisiológicos das plantas. Não houve efeito da inoculação mista para os parâmetros biométricos na cultivar de ciclo tardio, no entanto, houve efeito positivo na altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea, número e peso fresco de nódulos para as cultivares de ciclo médio e precoce. Os melhores resultados foram verificados para as concentrações de 200.000 a 300.000 células por semente e sendo esse efeito mais evidente em condições de déficit hídrico do solo. A inoculação mista de *B. japonicum* e *A. brasilense* não interfere nas respostas fisiológicas (fotossíntese líquida, taxa de condutância estomática de CO₂ foliar, taxa de transpiração foliar, déficit de pressão de vapor, concentração intercelular de CO₂, eficiência de uso da água, conteúdo hídrico foliar), concentração de prolina e acúmulo de N foliar, além de não atenuar o efeito deletério do déficit hídrico sobre esses parâmetros. Os efeitos da limitação hídrica nos processos fisiológicos e acúmulo de N se manifestaram com maior intensidade em cultivares de ciclo menor.

Palavras - chave: *Glycine max*, co-inoculação, fisiologia, condição hídrica.

INOCULATION MIXED WITH *BRADYRHIZOBIUM* AND *AZOSPIRILLUM* IN SOYBEAN CULTIVARS UNDER NORMAL CONDITION AND DEFICIT WATER SOIL

GENERAL ABSTRACT

The use of *Azospirillum brasilense* has been used in conjunction with *Bradyrhizobium* in order to improve the agronomic development of plants and to provide greater tolerance to environmental stresses. In this sense, the present work developed in the Prof^a Cinobelina Elvas *Campus* of the Universidade Federal do Piauí, located in the city of Bom Jesus, in the 2015/2016 harvest had the following objectives: i) to evaluate the effect of the mixed inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilense* via Seed in agronomic performance in soybean cultivars under normal conditions and water deficit in Piauí cerrado soil; ii) to evaluate the physiological responses of soybean and the nitrogen supply as a function of the mixed inoculation of *B. japonicum* with *A. brasilense* via seed, under normal conditions and soil water deficit. The morphophysiological parameters of the plants were evaluated. There was no effect of the mixed inoculation for the biometric parameters in the late cycle cultivar; however, there was a positive effect on plant height, leaf area, shoot dry mass, number and fresh nodule weight for medium and early cycle cultivars. The best results were verified for the concentrations of 200.000 to 300.000 cells per seed and this effect being most evident in soil water deficit conditions. The mixed inoculation of *B. japonicum* and *A. brasilense* does not interfere in the physiological responses (net photosynthesis, stomatal CO₂, leaf transpiration rate, vapor pressure deficit, intercellular CO₂ concentration, water use efficiency and foliar water content), proline concentration and foliar N accumulation and does not attenuate the deleterious effect of water deficit on these parameters. The effects of water limitation on physiological processes and N accumulation were more intense in lower cycle cultivars.

Keywords: *Glycine max*, co-inoculation of seeds, water condition.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição química do solo coletado na camada (0-20 cm), antes da instalação do experimento em Bom Jesus - PI, safra 2015/2016. 11

Tabela 2. Análise de variância (valores de F) para clorofila total (CT), altura de planta (AP), nós reprodutivos (NR), área foliar (AF), volume radicular (VR), peso fresco de nódulos (PFN), peso seco de nódulos (PSN), número de nódulos (NN) massa seca parte aérea (MSPA), peso de cem grãos (PCG) e peso total de grãos por planta (PGP), em cultivares de soja submetidas a diferentes combinações de *Azospirillum brasilenses* com *Bradyrhizobium japonicum* via semente, em condições adequadas e de déficit hídrico no solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016. 14

Tabela 3. Valores médios de nós reprodutivos (NR), peso fresco de nódulos (PFN) e número de nódulos (NN), para a cultivar BMX 9086 IPRO, Bom Jesus – PI, safra 2015/16. 20

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química do solo coletado na camada (0-20 cm), antes da instalação do experimento em Bom Jesus - PI, safra 2015/2016. 32

Tabela 2. Análise de variância (valores de F) para as variáveis: fotossíntese líquida (A : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E : $\text{mmol} [\text{H}_2\text{O}].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), déficit de pressão de vapor (DPV : kPa), concentração intercelular de CO_2 (C_i : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{mol}^{-1}$), eficiência de uso da água (EUA : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2]. \text{mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$), conteúdo hídrico foliar (CHF : %), teor de prolina (*Prolina*: mg g^{-1} MF) e acúmulo de nitrogênio (N) (g planta^{-1}) em função da inoculação mista de *Azospirillum brasilense* e condição hídrica no cultivar de soja Brasmax 9086 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. 37

Tabela 3. Análise de variância (valores de F) para as variáveis: fotossíntese líquida (A : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E : $\text{mmol} [\text{H}_2\text{O}].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), déficit de pressão de vapor (DPV : kPa), concentração intercelular de CO_2 (C_i : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{mol}^{-1}$), eficiência de uso da água (EUA : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2]. \text{mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$), conteúdo hídrico foliar (CHF : %), teor de prolina (*Prolina*: mg g^{-1} MF) e acúmulo de nitrogênio (N) (g planta^{-1}) em função da inoculação mista de *Azospirillum brasilense* e condição hídrica no cultivar de soja Msoy 8372 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. 38

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a execução do experimento. Bom Jesus-PI, 2016. 11

Figura 2. Valores para altura de plantas (A), área foliar (B), peso fresco de nódulos (C), massa seca da parte aérea (D), número de nódulos (E), peso seco de nódulos (F) e volume radicular (G) em cultivares de soja, em função das diferentes concentrações *A. brasilense* com *B. japonicum*, Bom Jesus – PI, safra 2015/16. ** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student. Concentrações: 0= Apenas *B. japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *A. brasilense* juntamente com *B. japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente. 17

Figura 3. Valores para número de nódulos (A) e peso fresco de nódulos (B) para a cultivar M 8372 IPRO e volume radicular (C) para a cultivar M 7739 IPRO, em função da interação entre concentrações e condição hídrica do solo, Bom Jesus – PI, safra 2015/16. Concentrações: 0= Apenas *B. japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *A. brasilense* com *B. japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente. 18

Figura 4. Área foliar (A), massa seca parte aérea (B) altura de plantas (C) e peso de cem sementes (D) em cultivares de soja, sob condições adequadas e de déficit hídrico, em Bom Jesus, safra 2015/2016. Médias seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. 21

CAPÍTULO II

Figura 1. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a execução do experimento. Bom Jesus-PI, 2016. 32

Figura 2. Fotossíntese líquida (A), taxa de transpiração foliar (E), taxa de condutância estomática (g_s), déficit de pressão de vapor (DPV), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência de uso da água (EUA) em função da condição hídrica no cultivar de soja Brasmax 9086 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. DAFDH – dias após o fim do déficit hídrico. 39

Figura 3. Fotossíntese líquida (A), taxa de transpiração foliar (E), taxa de condutância estomática (g_s), déficit de pressão de vapor (DPV), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência de uso da água (EUA) em função da condição hídrica no cultivar de soja Msoy 8372 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. DAFDH – dias após o fim do déficit hídrico. 40

Figura 4. Conteúdo hídrico foliar em cultivares de soja ao final do período de submissão ao déficit hídrico (20 dias) e em condições adequadas de umidade do solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016. Letras diferentes diferem entre si de forma significativa pelo teste Tukey a 1%. 41

Figura 5. Teor de prolina foliar em cultivares de soja ao final do período de submissão ao déficit hídrico (20 dias) e em condições adequadas de umidade do solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016. Letras diferentes diferem entre si de forma significativa pelo teste Tukey a 5%..... 42

Figura 6. Acúmulo de nitrogênio (N) em dois cultivares de soja Brasmax 9086 IPRO (A) e Msoy 8372 IPRO (B) em função da inoculação mista de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* em condições normais e após 20 dias de limitação hídrica (umidade do solo em 40% da capacidade de campo). Bom Jesus – PI, safra 2015/16. Concentrações: 0= Apenas *Bradyrhizobium japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *Azospirillum brasilense* juntamente com *Bradyrhizobium japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente..... 44

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a principal oleaginosa cultivada no Brasil, ultrapassando os 33,2 milhões de hectares na safra (2015/2016) e produção de 95.3 milhões de toneladas e média de produtividade de 2.876 kg ha⁻¹ de grãos (Conab, 2016). Nesse cenário, destaca-se a região do cerrado piauiense, que na respectiva safra, apresentou uma área cultivada que ultrapassou os 565 mil ha (Conab, 2016). Essa região ganha importância à medida que é considerada por muitos como a última fronteira agrícola da região do cerrado.

Assim, o cultivo da soja continua sendo a principal atividade responsável pela expansão da fronteira agrícola no País. Contudo, a implantação dessa cultura nas novas áreas de cultivo, tem requerido novas tecnologias e manejo cultural adequado, principalmente em função das condições edafoclimáticas específicas dessa região (Petter et al, 2014). Nesse sentido, cultivares de soja de alto rendimento são desenvolvidas visando o aumento da produtividade, todavia, requerem grandes quantidades de nitrogênio (N) para atingir esses tetos de produtividades. No caso da cultura da soja, pelo alto teor de proteína nos grãos, a demanda em N é elevada. Segundo Hungria et al. (2007) para produzir 1.000 kg de grãos.ha⁻¹ de soja, são necessários cerca de 80 kg de N ha⁻¹. Considerando um rendimento de 3.000 kg de grãos ha⁻¹, a cultura necessita de 240 kg de N ha⁻¹.

Os solos brasileiros podem fornecer de 20 a 40 kg.ha⁻¹ de N e, considerando a contribuição máxima de N do solo, haveria uma pequena redução da demanda para 200 kg de N ha⁻¹ (Chueiri et al., 2005). De maneira geral apenas 50% do fertilizante aplicado é aproveitado, e os demais podem ser perdidos por lixiviação, escoamento superficial, desnitrificação e volatilização, aumentando assim, a demanda para 420 kg de N.ha⁻¹, ou 930 kg de uréia, que contém 45% de N. Cabe salientar, ainda, que o potencial genético da soja é estimado em, aproximadamente, 8.000 kg de grãos. ha⁻¹, rendimento esse que demandaria mais de 1.100 kg de N (Hungria et al., 2007) e considerando esse cenário, e caso houvesse a necessidade de suprimento de N via fertilização o cultivo dessa oleaginosa seria inviável economicamente.

A soja pode obter o N das seguintes fontes: o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; fertilizantes nitrogenados e processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) (Hungria et al., 2007). O sucesso da cultura da

soja, do ponto de vista econômico, depende exclusivamente da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Scholles; Vargas, 2004) que é realizada por microrganismos procariontes que possuem maquinário enzimático capaz de reduzir o nitrogênio molecular a amônia (Kerbaudy, 2004).

Atualmente, no Brasil as estirpes bacterianas recomendadas para a inoculação da soja são SEMIA 5079, SEMIA 5080, da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, e SEMIA 587 e SEMIA 5019, pertencentes às espécies *Bradyrhizobium elkani* (Mendes et al., 2014). Alves et al. (2006) observaram acúmulo médio de 193 kg ha⁻¹ de N na cultura da soja, proveniente da FBN. Todavia, em soja de alta produtividade e/ou em regiões onde há comprometimento do sistema simbiótico em função de condições edafoclimáticas, a capacidade de fornecimento do N pode não ser satisfatório (Petter et al., 2012).

Nesse sentido, uma técnica que vem se destacando é a inoculação mista, que consiste na utilização de associações de bactérias simbióticas com diazotróficas (assimbióticas) ou conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), os quais interagem sinergicamente (Ferlini, 2006; Bárbaro et al., 2009).

As BPCP são espécies que colonizam os tecidos, desempenhando um efeito benéfico no desenvolvimento (Klopper et al., 1980) melhorando a capacidade da planta a resistir ao estresse ambiental (Sturz; Nowak, 2000). Entre as BPCP encontra-se o gênero *Azospirillum*, que são bactérias associativas que vivem e fixam N₂ no solo e são capazes de penetrar nos espaços intercelulares das raízes e lá se alojam (Baldani et al., 1996) sem perder a capacidade de fixar N₂. Além disso, não são bactérias específicas, já que não apresentam preferências por plantas cultivadas, plantas daninhas, anuais ou perenes (Bashan; Holguin, 1997).

Segundo Bashan; Bashan, (2005) bactérias do gênero *Azospirillum* promovem o crescimento da planta pela fixação de nitrogênio, produção de fito-hormônios (giberelina, auxina e citocinina), estimulam a ramificação das raízes, aumentam a biomassa do sistema radicular e da parte aérea, aumentam a permeabilidade das membranas da raiz, melhoram a absorção de nutrientes, e aumentam a resistência a condições adversas como a seca.

A sensibilidade da soja ao déficit hídrico tende a aumentar, à medida que, a cultura passa para a fase reprodutiva, principalmente, na formação dos legumes e enchimento de grãos (Kron et al., 2008). Logo, a necessidade de água aumenta durante

o desenvolvimento da cultura chegando à exigência hídrica de 7 a 8 mm diários durante a floração e enchimento de grãos (R1 a R6) (Embrapa, 2007).

A eficiência no uso de água é de grande importância para a sobrevivência do vegetal em condição de baixa disponibilidade hídrica (Pimentel, 2004). Assim, por meio de alterações morfológicas e fisiológicas da planta, as diferentes espécies desenvolvem mecanismos para evitar ou tolerar a falta de água no solo (Machado, 2004), como a redução do potencial hídrico foliar, alteração da interceptação da radiação solar, fechamento estomático (Lawlor; Tezara, 2009; Pereira, 2012), redução da expansão foliar, aceleração da senescência com abscisão das folhas, ajustamento osmótico, modulação da partição de assimilados e defesas contra danos oxidativos (Taiz; Zeiger, 2013).

O ajuste osmótico ou acúmulo de solutos constitui-se um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para manutenção do volume e turgescência da célula e sob condições de déficit hídrico vários metabólitos são acumulados e atuam como osmólitos (moléculas orgânicas) não apenas na conservação da turgescência, mas também na detoxicação de espécies reativas de oxigênio (Marijuan; Bosch, 2013).

Um dos metabólitos produzidos pelas plantas durante estresses ambientais é a prolina. A prolina é um aminoácido, que sob diferentes estresses, pode aumentar até 100 vezes, em comparação ao de plantas cultivadas sob condições normais (Verbruggen; Hermans, 2008) e é armazenada no vacúolo ou no citosol celular (Marijuan; Bosch, 2013), sendo que nessas situações atua como mediador do ajustamento osmótico, preservando proteínas, enzimas e membranas celulares (Van Rensburg et al., 1993; Ashraf et al., 2011). A prolina pode ainda participar na constituição de um estoque de nitrogênio e carbono, que poderia ser utilizado depois do período de estresse (Taylor, 1996).

Estudos com a inoculação combinada de *Bradyrhizobium* e de *Azospirillum brasiliense* via semente, ainda são escassos e divergentes, e para a região do cerrado piauiense ainda não há relatos científicos sobre o tema. Sabe-se que existem diferentes interações entre bactérias e genótipos de plantas de soja, tornando necessário, estudos a fim de identificar a melhor combinação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasiliense* e seus efeitos em cultivares adaptadas as condições edafoclimáticas do cerrado piauiense.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P. J.; URQUIAGA, S. Fixação Biológica de Nitrogênio e Fertilizantes Nitrogenados no Balanço de Nitrogênio soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 3, p. 449- 456, 2006.

ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M. R. **Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients**. *Advances in Agronomy*, v.111, p.249-296, 2011.

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

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Bacteria/Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, v.1, p. 103-115, 2005.

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

BALDANI, J. I., POT, B., KIRCHHOF, G., FALSEN, E., BALDANI, V. L. D. OLIVARES, F. L., HOSTE, B. KERSTERS, K., HARTMANN, A.G., DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum species 3*. **International Journal of Systematic Bacteriology** v.46 p.802-810, 1996.

CHUEIRI, A. W.; PAJARA, F.; BOZZA, D. **Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja**. São Paulo: Manah, 2005. 4 p. (Informativo Técnico, 169).

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento**, Julho 2016. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_11_17_36_02_boletim_graos_julho_2016.pdf. Acesso em 20 de jul. 2016.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento**, Maio 2015/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2015. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_05_13_08_46_55_boletim_graos_maio_2015.pdf, Acesso em: 05 de Jul. 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ecofisiologia da Soja**. Circular Técnica 48, Londrina, Setembro, 2007.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*, 2006.** Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm>. Acesso: 05 jul. 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: Embrapa Cerrados, 2007.

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

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Current Microbiology** 4, 317-320, 1980.

KRON, A.P.; SOUZA, G.M.; RIBEIRO, R. V. Water deficiency at different developmental stages of *Glycine max* can improve drought tolerance. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.43-49, 2008.

LAWLOR, D. W.; TEZARA W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany** v.103 p. 561-579, 2009.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, n. 15, p. 183-190, 2000.

SCHOLLES, D.; VARGAS, L. K. Viabilidade da inoculação de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* em solo inundado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.28, n.6, p. 973-979, 2004

MACHADO, A. V. **Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* Mart. (Chloranthaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, p.660-666, 2013.

MENDES, L. C.; REIS JUNIOR, F.B.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Embrapa Cerrados: 37 anos de contribuições para o avanço da FBN no Brasil In: Anais da XVI RELARE – **Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. p.60-61 (Embrapa Soja. Documentos, 350).

PEREIRA, J. W.; MELO FILHO, P. A.; ALBUQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. M.; SANTOS, R. C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.43, n.4, p.766-773, out./dez, 2012.

PETTER, F. A., PACHECO, L. P., ALCÂNTARA NETO, F.; SANTOS, G. G. Respostas de cultivares de soja à adubação nitrogenada tardia em solos de cerrado. **Revista Caatinga**, v.25, p. 67-72, 2012.

PETTER, F. A. ALVES, A. U.; SILVA, J. A.; CARDOSO, E. A.; ALIXANDRE, T. F.; ALMEIDA, F.A; PACHECO, L. P. Produtividade e qualidade de sementes de soja em função de doses e épocas de aplicação de potássio. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 89-100, jan./fev. 2014.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotianatabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. **Proline accumulation in plants: a review**. *Amino Acids*, v.35, p.753-759, 2008.

INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* NA SOJA: DESEMPENHO AGRONÔMICO E NODULAÇÃO

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilenses* via semente no desempenho agronômico e nodulação de cultivares de soja em condição normal e de déficit hídrico do solo no cerrado piauiense. O experimento foi realizado em ambiente protegido, em área experimental da Universidade Federal do Piauí na safra 2015/2016. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 x 2, sendo constituídos por cinco concentrações de *A. brasilenses* (0,0; $1,5 \times 10^5$; $2,0 \times 10^5$; $2,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ células/semente combinado com $1,2 \times 10^5$ células/semente de *B. japonicum*), três cultivares de soja, sendo um de ciclo tardio Brasmax 9086 IPRO, um de ciclo médio Msoy 8372 IPRO e um precoce Msoy 7739 IPRO e dois regimes hídricos (condições adequadas de umidade e déficit hídrico do solo) com oito repetições. Foram avaliados os parâmetros biométricos das plantas e dos nódulos radiculares. Não houve efeito da inoculação mista para os parâmetros biométricos na cultivar de ciclo tardio, no entanto, houve efeito positivo na altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea, número e peso fresco de nódulos para as cultivares de ciclo médio e precoce. Os melhores resultados foram verificados para as concentrações de 200.000 a 300.000 células por semente e sendo esse efeito mais evidente em condições de déficit hídrico do solo.

Palavras-chave: *Glycine max*, co-inoculação, semente, condição hídrica.

MIXED INOCULATION WITH BRADYRHIZOBIUM AND AZOSPIRILLUM IN SOYBEAN: AGRONOMIC PERFORMANCE AND NODULATION

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the mixed inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilenses* via seed in normal and soil water deficit cultivars in the cerrado of Piauí. The experiment was carried out in a protected environment, in an experimental area of the Universidade Federal do Piauí, in the 2015/2016 harvest. The design was completely randomized, in a 5 x 3 x 2 factorial scheme, consisting of five concentrations of *A. brasilenses* (0.0, $1,5 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ and $3,0 \times 10^5$ cells / seed combined with $1,2 \times 10^5$ cells / seed of *B. japonicum*), three soybean cultivars, one being late-cycle Brasmax 9086 IPRO, one medium-cycle Msoy 8372 IPRO and one early Msoy 7739 IPRO and Two water regimes (adequate moisture conditions and soil water deficit) with eight replications. The biometric parameters of plants and root nodules were evaluated. There was no effect of the mixed inoculation for the biometric parameters in the late cycle cultivar; however, there was a positive effect on plant height, leaf area, shoot dry mass, number and fresh nodule weight for medium and early cycle cultivars. The best results were verified for the concentrations of 200.000 to 300.000 cells per seed and this effect being most evident in soil water deficit conditions.

Keywords: *Glycine max*, co-inoculation, seed, water condition.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a soja é a cultura que apresentou a maior expansão em área plantada nos últimos anos, ultrapassando 33,2 milhões de hectares na safra 2015/2016 e produção próxima a 95 milhões de toneladas (Conab, 2016). Portanto, o cultivo da soja continua sendo a principal atividade responsável pela expansão da fronteira agrícola no país, com destaque para a região MATOPIBA, que se refere às áreas de chapada dos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia. Contudo, a implantação dessa cultura em novas áreas de cultivo, tem requerido novas tecnologias e manejo cultural adequado, principalmente em função das condições edafoclimáticas específicas dessa região (Petter et al., 2014).

Cultivares de soja de alto rendimento são comumente lançados no mercado anualmente visando o aumento da produtividade, todavia, problemas com veranicos, conhecidos como períodos prolongados sem chuva durante o verão, tem se tornado cada vez mais frequente nas últimas safras (Franchini et al., 2009), limitando assim a obtenção desses altos rendimentos. Ademais, esses cultivares requerem grandes quantidades de nutrientes, dentre os quais pode-se destacar o nitrogênio (N), fato este que pode ser um complicador pensando em matéria orgânica (MO) como parte da fonte de N para as plantas, visto que nessa região os níveis de matéria orgânica do solo (MOS) são baixos e a decomposição é elevada em função de altas temperaturas.

Segundo Machado et al. (2012), com o avanço das pesquisas em microbiologia do solo tornou-se possível à obtenção de quase todo o N demandado pela cultura, com o uso de estirpes de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*). Alves et al. (2006) observaram acúmulo médio de 193 kg ha⁻¹ de N na cultura da soja, proveniente da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Todavia, em soja de alta produtividade e/ou em regiões onde há comprometimento do sistema simbiótico em função de condições edafoclimáticas, a capacidade de fornecimento do N pode não ser satisfatório (Petter et al., 2012), demandando assim, estudos com o uso de novas técnicas a fim de suprir essa demanda.

Nesse sentido, uma técnica que vem se destacando é a inoculação mista, que consiste na combinação de microrganismos simbióticos com microrganismos associativos, principalmente do gênero *Azospirillum*, na busca de proporcionar maior tolerância a estresses ambientais e melhorar o desempenho agrônomo das culturas. Ao

utilizar o *Azospirillum brasilense*, vem sendo observado o efeito benéfico da associação entre os microrganismos, principalmente pela capacidade que as bactérias desse gênero têm de produzir fitohormônios que promovem um maior desenvolvimento do sistema radicular e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (BÁRBARO et al., 2009) em períodos de déficit hídrico. Contudo, os resultados na cultura da soja por exemplo são escassos e divergentes.

Segundo Bashan; Bashan (2005) bactérias do gênero *Azospirillum* promovem o crescimento da planta pela fixação de N, produção de fitohormônios (giberelina, auxina e citocinina), estimulam a ramificação das raízes, aumentam a biomassa da parte aérea e do sistema radicular, aumentam a permeabilidade das membranas da raiz, melhoram a absorção de nutrientes, e aumentam a tolerância a condições adversas como o estresse hídrico.

Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilenses* via semente no desempenho agrônomico cultivares de soja sob condição normal e de déficit hídrico em solo do cerrado piauiense.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo

O experimento foi realizado em ambiente protegido, na área experimental do *Campus* da Universidade Federal do Piauí – UFPI em Bom Jesus-PI (09° 04'28" de latitude Sul, 44° 21'31" de longitude Oeste e com altitude média de 277 m), na safra 2015/2016. O clima da região é do tipo Aw segundo a classificação climática global de Köppen, com duas estações bem definidas, sendo uma seca no período de maio a setembro e outra chuvosa de outubro a abril. Os dados climáticos foram coletados diariamente, no interior do ambiente protegido.

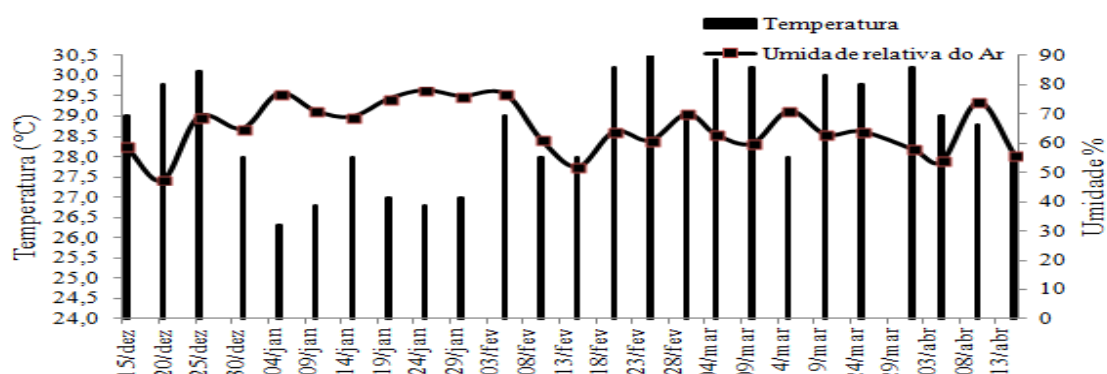


Figura 1. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a execução do experimento. Bom Jesus-PI, 2016.

O solo foi coletado em área de produção de soja em Bom Jesus na camada de 0-20 cm, com populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* por inoculações em anos anteriores, apresentando, no mínimo, $3,57 \times 10^3$ células de *Bradyrhizobium/g*⁻¹ de solo, determinado pelo método do número mais provável (NMP), conforme metodologia de Andrade; Hamakawa (1994). Realizou-se análise química do solo utilizado no experimento (Tabela 1) anterior ao cultivo e procedeu-se a adubação conforme os resultados obtidos.

Tabela 1. Composição química do solo coletado na camada (0-20 cm), antes da instalação do experimento em Bom Jesus - PI, safra 2015/2016.

pH	P (Mehlich)	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ²⁺	H+Al
H ₂ O	-----mg dm ⁻³ -----					
5,1	27,29	87,00	1,53	0,75	0,00	2,48
SB	CTC	V	M.O	Argila	Silte	Areia
	-----cmol _c dm ⁻³ -----					
2,50	4,98	50,23	1,41	10,1	11,0	78,9

SB - soma de bases; CTC - capacidade de troca de cátions a pH 7,0; V - saturação por bases; MO - teor de matéria orgânica do solo.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 x 2, sendo constituídos por quatro concentrações de *Azospirillum brasilense* (0; $1,5 \times 10^5$; $2,0 \times 10^5$; $2,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ células/sementes combinado com $1,2 \times 10^5$ células/semente de *Bradyrhizobium japonicum.*), três cultivares de soja, sendo um de ciclo tardio Brasmax 9086 IPRO e um de ciclo médio Msoy 8372 IPRO e outro de ciclo precoce Msoy 7739 IPRO; dois regimes hídricos (condições adequadas de umidade e déficit hídrico do solo), perfazendo 30 tratamentos com oito repetições. Quatro repetições foram utilizadas para avaliações destrutivas.

As sementes das cultivares foram previamente tratadas com o fungicida Carbendazin + Thiran. Foi utilizado o inoculante líquido com *B. japonicum* contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 na concentração de 5×10^9 células viáveis por ml e as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilenses* (2×10^8 células viáveis por ml). O cálculo do número de células por semente foi realizado conforme Araújo (1999). As sementes foram co-inoculadas a sombra e em seguida plantadas em vasos, com capacidade de 8 dm³. A semeadura das cultivares foi realizada no dia 14 dezembro, semeando quatro sementes por vaso, com posterior desbaste, deixando apenas duas. No estágio fenológico V3 foi realizada uma aplicação via foliar de CoMo10 (1,5% de Cobalto e 15% de Molibdênio) na dose de 100 mL ha⁻¹.

Aos 20 dias após a emergência foi aplicado à condição de déficit hídrico, simulando um veranico de 21 dias. O controle de umidade do solo foi determinado da seguinte forma: a) determinou-se o peso dos vasos na capacidade de campo (CC) por meio da metodologia adaptada de Bonfim - Silva et al. (2011), no qual saturou-se o solo com água, deixando-os em repouso por 12 horas para escorrer a água em excesso e determinou-se o peso. Em seguida, com o valor de CC calculou-se a condição adequada de umidade de 80%, e o déficit de 40% da CC.

2.3 Variáveis estudadas

No estágio fonológico R2 (florescimento pleno) pela escala fonológica de Fehr e Caviness (1977) foi determinado o teor de clorofila, utilizando clorofilometro modelo “Clorofilog – CFL1030”, medindo - se três pontos em diferentes partes na mesma folha no limbo foliar entre as nervuras no terceiro trifólio do ápice para a base. Altura de plantas (cm) – foi determinado da superfície do solo ao ápice do meristema apical com auxílio da régua milimétrica. Nós reprodutivos - mensurando de forma manual no vaso.

Área foliar (cm^2) – determinada com o medidor de área foliar eletrônico modelo Li-Cor, L1-3100®. Massa seca da parte aérea (g) – determinada pela coleta das duas plantas da parcela. As amostras foram colocadas em sacos de papel e secadas em estufa a 65°C , até atingir peso constante.

Volume radicular (cm^3) – realizado por meio da medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocando-se as raízes, após lavagem e secagem em proveta contendo um volume conhecido de água. Pela diferença, obtém-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ($1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$), segundo a metodologia descrita por Basso (1999). Também foi determinado no sistema radicular o número e peso de nódulos fresco e seco. A avaliação de nódulos foi realizada coletando-se as duas plantas da parcela. Os nódulos foram lavados, destacados, contados, pesados e secos em estufa de circulação forçada a 65°C , até obter peso constante e determinado o peso de nódulo seco. Na colheita foi avaliado o peso de cem sementes e peso de grãos por planta.

2.4 Análise estatística

Embora o delineamento tenha sido em esquema fatorial triplo, a análise estatística foi realizada como fatorial duplo, visto que as cultivares não foram comparadas entre si, pois são de ciclos diferentes e não faz sentido compará-los principalmente porque envolve a avaliação de parâmetros biométricos. Assim, os dados das cultivares estão apresentados de maneira separada, sem analisar a interação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis significativas comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2000). Os dados quantitativos foram avaliados por meio de análise de regressão, em que as equações foram ajustadas utilizando-se os parâmetros de correlação e determinação para as variáveis analisadas, utilizando o programa estatístico SigmaPlot.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Para a cultivar de ciclo tardio BMX 9086 IPRO com exceção de peso de cem grãos (PCG), peso total de grãos por planta (PGP), peso seco de nódulos (PSN), volume radicular (VR) e clorofila total (CT) houve efeito para os demais parâmetros ($p < 0,05$) apenas para a condição de umidade do solo (Tabela 2) enquanto que as cultivares de ciclo médio e precoce, M 8372 IPRO e M 7739 IPRO, respectivamente, responderam significativamente as concentrações, salvo para as variáveis, CT, nó reprodutivo (NR), PCS e PGP. Para a condição hídrica houve efeito significativo ($p < 0,05$) nas três cultivares para altura de planta (AP), área foliar (AF) e massa seca da parte aérea (MSPA) e PCS nas cultivares M 8372 IPRO e M 7739 IPRO. Em relação à interação entre concentrações e condição hídrica houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável VR na cultivar M 7739 IPRO, PSN e número de nódulos (NN) para cultivar M 8372 IPRO.

Tabela 2. Análise de variância (valores de F) para clorofila total (CT), altura de planta (AP), nós reprodutivos (NR), área foliar (AF), volume radicular (VR), peso fresco de nódulos (PFN), peso seco de nódulos (PSN), número de nódulos (NN) massa seca parte aérea (MSPA), peso de cem grãos (PCG) e peso total de grãos por planta (PGP), em cultivares de soja submetidas a diferentes combinações de *Azospirillum brasilenses* com *Bradyrhizobium japonicum* via semente, em condições adequadas e de déficit hídrico no solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016.

Fonte de Variação	Cultivar BMX 9086 IPRO										
	CT	AP	NR	AF	VR	PFN	PSN	NN	MSPA	PCG	PGP
Inoculação mista (I)	2,30 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,85 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,42 ^{ns}	2,01 ⁿ
Condição Hídrica (C)	1,17 ^{ns}	23,44*	5,58**	18,82*	1,64 ^{ns}	8,58**	4,12 ^{ns}	14,68**	19,73**	0,02 ^{ns}	2,60 ^{ns}
I x C	1,18 ^{ns}	0,79 ^{ns}	1,12 ^{ns}	1,09 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,63 ^{ns}	1,35 ^{ns}	0,88 ^{ns}
CV %	9,38	13,47	14,08	25,23	29,23	34,37	28,48	21,21	18,13	13,17	20,57
Fonte de Variação	Cultivar M 8372 IPRO										
	CT	AP	NR	AF	VR	PFN	PSN	NN	MSPA	PCG	PGP
Inoculação mista (I)	0,14 ^{ns}	10,45**	0,37 ^{ns}	10,45**	5,12**	3,18*	2,68*	5,75**	4,71*	2,74	0,68 ^{ns}
Condição Hídrica (C)	0,56 ^{ns}	7,70*	0,68 ^{ns}	7,70*	0,24 ^{ns}	1,41 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,65 ^{ns}	17,19**	9,56**	0,05 ^{ns}
I x C	0,62 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,88 ^{ns}	1,96 ^{ns}	2,25 ^{ns}	3,29*	2,57*	1,75 ^{ns}	1,27 ^{ns}	0,82 ^{ns}
CV %	6,38	9,76	12,17	9,76	25,05	23,23	19,56	19,79	20,66	10,30	16,78
Fonte de Variação	Cultivar M 7739 IPRO										
	CT	AP	NR	AF	VR	PFN	PSN	NN	MSPA	PCG	PGP
Inoculação mista (I)	2,57 ^{ns}	9,23**	1,73 ^{ns}	10,61**	6,70**	6,60**	6,78**	3,83*	4,36**	1,02 ^{ns}	0,84 ^{ns}
Condição Hídrica (C)	0,74 ^{ns}	6,12*	1,22 ^{ns}	7,38*	5,52*	0,75 ^{ns}	2,36 ^{ns}	2,17 ^{ns}	6,46**	10,08**	1,43 ^{ns}
I x C	2,29 ^{ns}	1,82 ^{ns}	0,26 ^{ns}	1,54 ^{ns}	3,22*	0,95 ^{ns}	1,22 ^{ns}	0,90 ^{ns}	1,93 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,46 ^{ns}
CV %	6,57	10,74	9,18	22,37	26,46	30,17	27,84	21,44	45,60	11,48	16,61

** e * significativo a 1 e 5% respectivamente; ^{ns} não significativo pelo teste F.

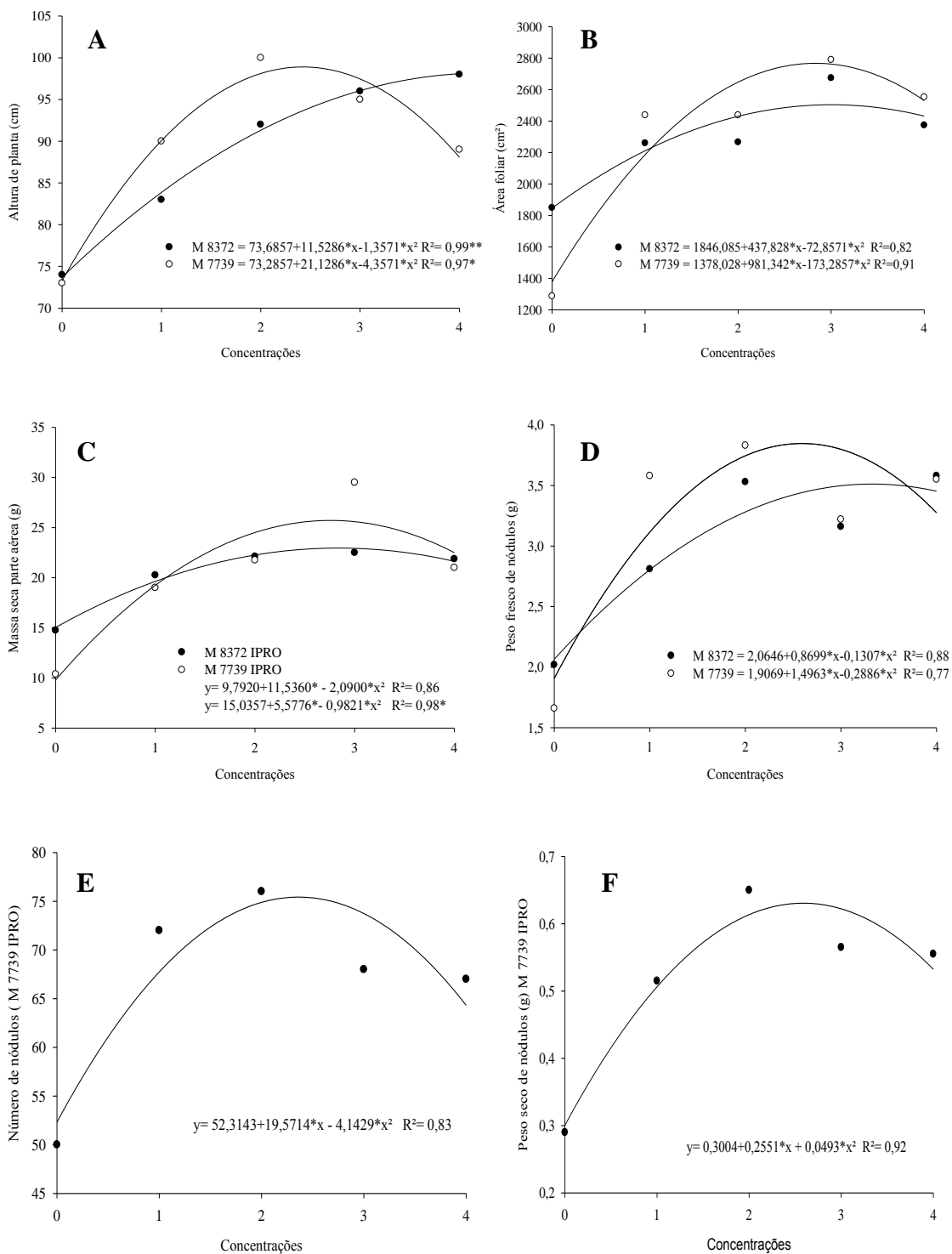
Esta variabilidade de resultados entre as três cultivares para o fator inoculação mista está relacionada a características genéticas das cultivares. Bulegon et al. (2015) avaliando os componentes de produção e produtividade de duas cultivares de soja submetidas à inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* concluíram que os dois genótipos apresentam capacidade de resposta diferente, sendo uma mais responsiva a inoculação mista com bactérias diazotróficas. Barbáro et al. (2009) também avaliaram diferentes cultivares quanto ao potencial de nodulação e observaram diferentes interações entre bactérias e genótipos de soja.

Quanto à altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea (Figura 2. A, B, C) a inoculação mista apresentou resultados superiores ao tratamento controle sem *A. brasilenses* em ambos os cultivares, M 8372 IPRO e M 7739 IPRO. Os maiores valores de altura de planta foram encontrados com as concentrações estimadas de 300.000 células/semente para a cultivar de ciclo médio e 201.650 células/semente na cultivar precoce. Já para a área foliar e massa seca da parte aérea os maiores valores foram encontrados com as concentrações estimadas de 250.000 e 229.166 células/semente, respectivamente, para a cultivar de ciclo médio e 257.000 e 235.833 células/semente, para a cultivar precoce.

Resultados semelhantes foram encontrados por Benintende et al. (2010) e Bulegon et al. (2016) ao comparar o efeito da inoculação mista observaram aumento do crescimento das plantas e da massa seca da parte aérea. Da mesma forma, Gitti et al., 2012 verificou maiores valores de massa seca de parte aérea em plantas de feijão que receberam inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes. Costa et al. (2014) avaliando diferentes estirpes verificaram que bactérias não nodulíficas como a do gênero *Azospirillum* promoveram o crescimento das plantas, possivelmente através da atuação em outros processos biológicos fitoestimuladores diferentes da FBN, como por exemplo, a síntese de ácido indolacético.

Ao analisar os dados para o número e peso seco de nódulos na cultivar M 7739 IPRO (Figura 2. E, F) observou-se que a inoculação mista nas doses estimadas de 196.666 e 215.000 células/semente, respectivamente proporcionou aumento de 33% no número de nódulos e 54% no peso seco de nódulos quando comparados à testemunha. Esses resultados corroboram com Uhrich; Benintende (2005) que verificaram incremento 12% no número e no peso de nódulos quando avaliados no estágio

fonológico V4 e 29% no estágio fonológico R4, com a inoculação mista de *A. brasiliense* com *B. japonicum* na cultura soja, quando comparado com a inoculação simples de *B. japonicum*.



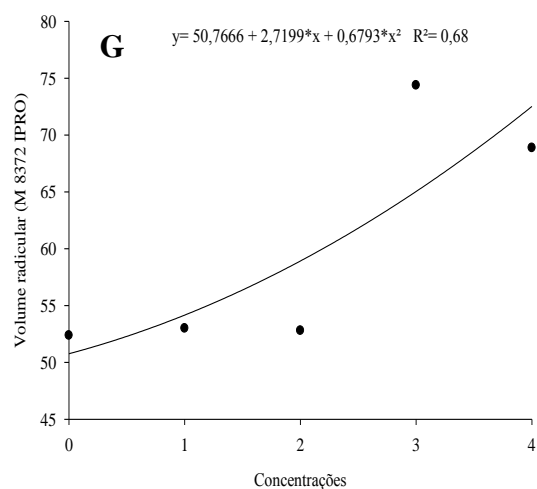


Figura 2. Valores para altura de plantas (A), área foliar (B), peso fresco de nódulos (C), massa seca da parte aérea (D), número de nódulos (E), peso seco de nódulos (F) e volume radicular (G) em cultivares de soja, em função das diferentes concentrações *A. brasilense* com *B. japonicum*, Bom Jesus – PI, safra 2015/16. ** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student. Concentrações: 0= Apenas *B. japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *A. brasilense* juntamente com *B. japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente.

Sistema radicular com maiores superfícies de absorção e eficiência na aquisição de água e nutrientes é uma característica desejável, sendo assim, observou-se neste trabalho (Figura 2 G) um aumento do volume radicular com a inoculação mista na cultivar M 8372 IPRO. German et al. (2000), avaliando a morfologia das raízes de plantas de feijoeiro comum após inoculação com *A. brasilense*, obtiveram aumento no comprimento e peso fresco de raízes em 95 e 66 %, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação. Também se observa na figura 3 C a interação entre concentrações de *A. brasilense* e condição hídrica do solo na cultivar M 7739 IPRO para a variável volume radicular. O maior volume radicular foi evidenciado na concentração estimada de 192.000 células/sememente para o tratamento sem déficit hídrico, já na condição de déficit hídrico o volume radicular foi crescente conforme o aumento das concentrações de *A. brasilense* na semente. Esse fato pode ser atribuído pelo estímulo de crescimento de raízes laterais e adventícias, alongamento das células e diferenciação vascular provocado pelo ácido indolacético (AIA) (Taiz; Zeiger, 2013), liberados pela bactéria *A. brasilense*. Plantas com elevada concentração deste fito hormônio tendem apresentar crescimento das raízes primárias melhorando o contato com o solo e, conseqüentemente, aumento da área de absorção (Vieira et al., 2013).

Para o número e peso seco de nódulos (Figura 3 A, B) houve interação significativa entre concentrações de *A. brasilense* e condição hídrica do solo na cultivar M 8372 IPRO. O número de nódulos foi crescente com o aumento das concentrações de células/semente evidenciando o número máximo de 88 e 85 nódulos/planta, nas doses estimadas 225.000 e 210.000 células/semente para os tratamentos com déficit e sem déficit hídrico do solo, aumento de 43% e 39% em número de nódulos, respectivamente, comparado com a testemunha. O peso seco de nódulos aumentou 38,4% na dose estimada de 241.500 células/semente quando comparado com a testemunha, sem déficit hídrico.

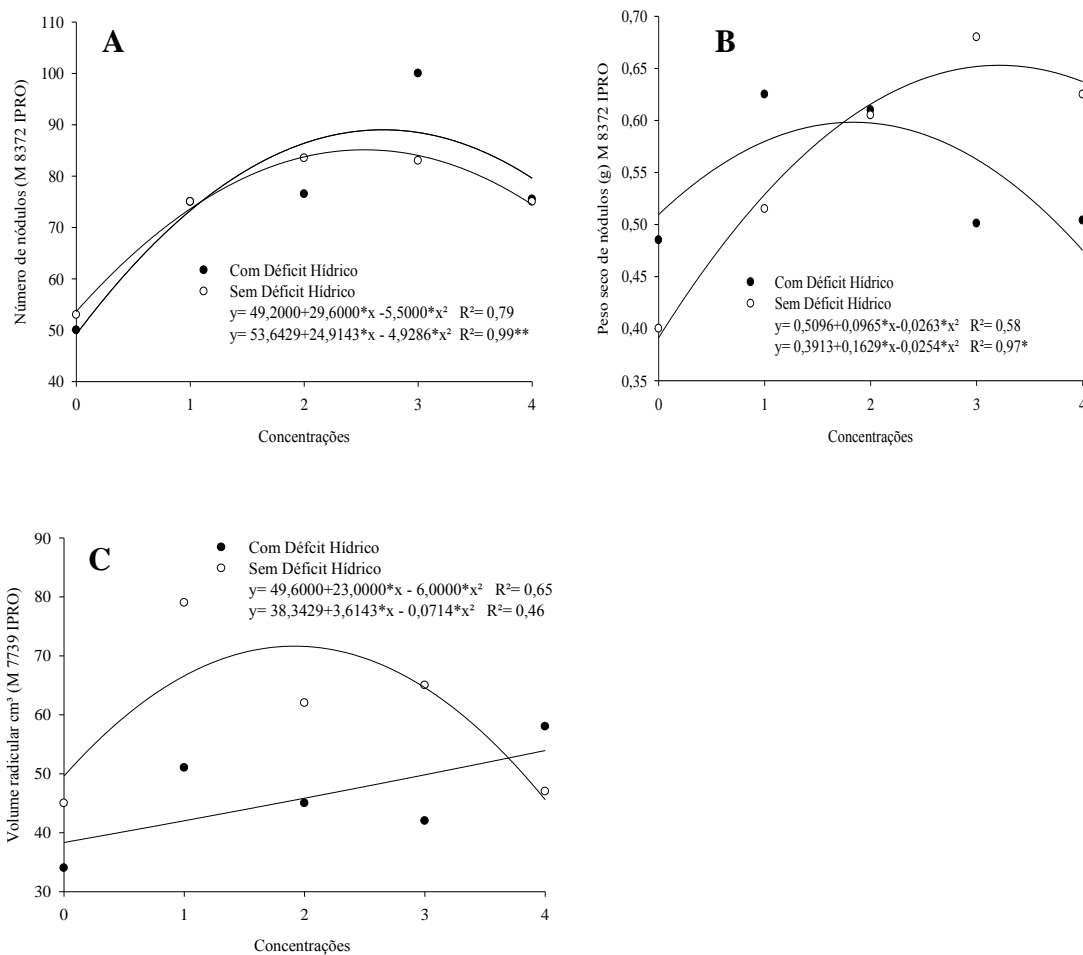


Figura 3. Valores para número de nódulos (A) e peso fresco de nódulos (B) para a cultivar M 8372 IPRO e volume radicular (C) para a cultivar M 7739 IPRO, em função da interação entre concentrações e condição hídrica do solo, Bom Jesus – PI, safra 2015/16. Concentrações: 0= Apenas *B. japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *A. brasilense* com *B. japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente.

Segundo Chalk et al. (2010), quando a umidade do solo está abaixo de 50% da capacidade de campo é comum o aparecimento de efeitos negativos ao processo de FBN. O déficit hídrico do solo desencadeia uma série de respostas fisiológicas e anatômicas nas plantas, como a diminuição da emissão de pêlos radiculares, descontinuidade da síntese de leghemoglobina e abortamento de nódulos (Goormachting et al., 2004). Esses efeitos provocam também a redução da população de microrganismos, pois, além de fazer parte da estrutura celular, a água é indispensável para maioria das reações do solo, como liberação de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, crescimento vegetal e exsudação radicular e estas são essenciais ao desenvolvimento da microbiota do solo (Sadowsky, 2005).

Diante disso, fica evidenciada a interferência do *Azospirillum* no número e peso de nódulos mesmo em solo com umidade de 40% da capacidade de campo. Assim, pode-se inferir que o aumento da nodulação pela inoculação mista de *A. brasilense* com *B. japonicum* pode estar relacionada a fito hormônios (giberelina, auxina e citocinina) Bashan; Bashan (2005), esses, responsáveis pelo incremento de pêlos e raízes laterais, assim, aumentando os sítios de infecção para microrganismos nodolíficos e consequentemente aumento de número de nódulos por planta.

Resultados semelhantes foram encontrados por Benintende et al. (2010) que na condição de déficit hídrico do solo observaram aumento significativo no peso dos nódulos em relação à inoculação com apenas *B. japonicum*. Do mesmo modo, Chibeba et al. (2015) verificaram nodulação mais precoce e maior massa seca de nódulos com a inoculação mista de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium*. No entanto, estes resultados contradizem aos obtidos por Zuffo et al. (2015) que não obtiveram respostas positivas com a co-inoculação sobre altura de planta, massa seca de nódulos e de raízes e teor de clorofila em cultivares de soja.

Outra evidencia observada neste trabalho é que a cultivar BMX 9086 IPRO não apresenta resposta à inoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium*, contudo, quando avaliada em condição de déficit hídrico (Tabela 3) o número de nódulos foi menor em relação à condição normal de umidade do solo. Tal efeito pode ser atribuído à baixa densidade e ramificações de pêlos radiculares desta variedade, consequentemente reduziu os sítios de infecções pelo *Bradyrhizobium*. Assim, fica evidente que a resposta das cultivares a inoculação mista está relacionada à sensibilidade ao déficit hídrico, pois

o efeito deste na morfologia do sistema radicular parece governar o processo de simbiose em inoculação mista.

Tabela 3. Valores médios de nós reprodutivos (NR), peso fresco de nódulos (PFN) e número de nódulos (NN), para a cultivar BMX 9086 IPRO, Bom Jesus – PI, safra 2015/16.

Tratamento	NR	PFN (g)	NN
Com déficit hídrico	8,5 b	2,25 b	57 b
Sem déficit hídrico	9,5 a	3,10 a	73 a
CV%	14,08	34,37	21,21

Médias seguidas de letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey a 5%.

Embora tenha ocorrido ganhos no número e no peso de nódulos, com o uso de *A. brasilense*, todos os tratamentos apresentaram uma nodulação adequada, uma vez que, o peso de nódulos variando entre 0,1 a 0,2 gramas ou 10 a 30 nódulos/planta seria suficiente para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (Hungria et al., 2007). No entanto, a fixação de N₂ está estreitamente relacionada à massa de nódulo e a elevada nodulação alcançada pelas cultivares de soja neste estudo confirma o bom desempenho dos genótipos em relação à FBN.

Na cultivar de ciclo tardio (Tabela 3) houve redução de 27 e 21,9 % o peso fresco e numero de nodulos, respectivamente para o tratamento com déficit hídrico. A redução no número de nódulos em condições de déficit hídrico também foi verificado por Prete et al. (2012) com redução do número de nódulos em 50% e da massa de nódulos em 67% em relação ao controle sem estresse hídrico. Zilli et al. (2013) avaliando a dinâmica da população de rizóbios presentes em solos de Cerrado de Roraima após o cultivo de soja e durante o período de estiagem concluíram que ocorre uma drástica redução na densidade de rizóbios no solo, que pode exceder os 99%, considerando a população no início e final do período.

Analisando o efeito isolado da condição hídrica para a área foliar (Figura 4 A), as três cultivares, tanto de ciclo tardio, médio e precoce apresentaram uma redução de 30, 18 e 17%, respectivamente, quando comparado com as plantas sem déficit hídrico. Esses resultados corroboram os obtidos por Fioreze et al. (2011) que verificaram decréscimo na área foliar ao avaliar diferentes genótipos de soja submetidos à indução de déficit hídrico de alta intensidade, em casa de vegetação. Verifica-se que o efeito

deletério do déficit hídrico foi mais intenso na cultivar de ciclo tardio, o que pode ter suprimido um possível efeito da inoculação mista. Assim, a resposta da inoculação mista é mais evidente em condições adversas de umidade do solo em cultivares de soja de ciclo precoce e médio.

A redução da área foliar proporciona menores ganhos em massa seca, o que foi verificado neste trabalho. A massa seca das plantas está diretamente associada à capacidade de fixação de CO₂ atmosférico através da fotossíntese, e esta, é tanto mais elevada quanto maior for à área foliar e quanto mais tempo permanecer ativa (Manfron et al., 2003).

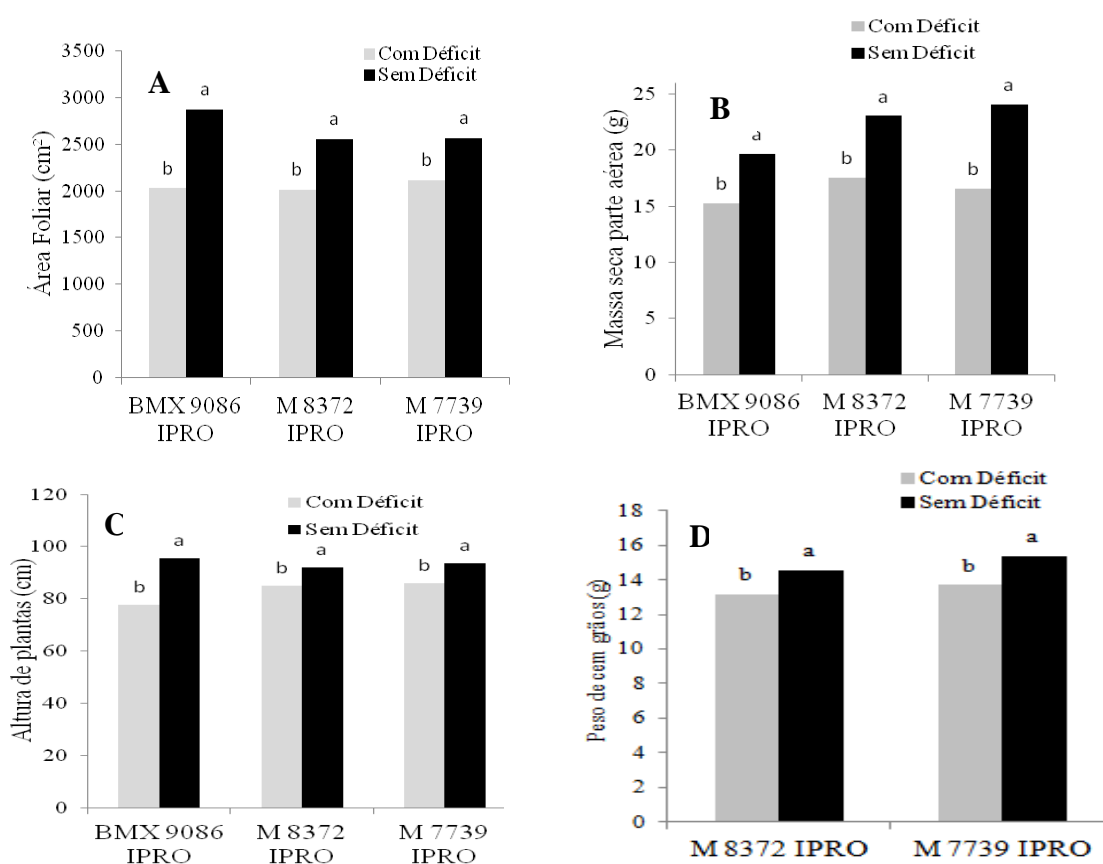


Figura 4. Área foliar (A), massa seca parte aérea (B) altura de plantas (C) e peso de cem grãos (D) em cultivares de soja, sob condições adequadas e de déficit hídrico, em Bom Jesus - PI, safra 2015/2016. Médias seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Outra característica verificada neste trabalho é a redução da altura de plantas (Figura 4 C) quando submetidas ao déficit hídrico. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o déficit hídrico afeta o funcionamento dos processos fisiológicos da soja como, por exemplo, o fechamento estomático, com isso, a pouca

disponibilidade de água interfere na expansão celular e conseqüentemente no alargamento foliar (Taiz e Zeiger, 2013). Outro fator importante que pode ter influenciado esse resultado é que as plantas expostas ao déficit hídrico exibem desequilíbrio na captação de energia e no metabolismo, pois ocasiona uma diminuição na reação fotoquímica e aumento na dissipação de energia (Lawlor; Tezara, 2009), resultando em redução na assimilação de carbono pela folha (Chaves; Oliveira, 2004).

Houve redução no peso de cem grãos, para o tratamento com déficit hídrico nos cultivares de ciclo médio e precoce (Figura 4 D). Esses resultados mostram que plantas expostas ao déficit hídrico mesmo ainda na fase vegetativa reduzem o peso de grãos. Resultados obtidos por Rambo et al. (2003) também constataram redução no peso do grão em função do estresse hídrico. Isso pode ser explicado pelo fato de que o déficit hídrico afeta a atividade fotossintética e pela menor remobilização de nutrientes para os grãos (Souza et al., 1997).

Embora tenha ocorrido ganhos com a inoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium* em variáveis relacionadas aos componentes de produção, a inoculação mista não teve efeito significativo no peso de cem grãos e no peso total de grãos por planta comparado com a testemunha. Esses dados corroboram com os obtidos por Bárbaro et al. (2009) e Zuffo et al. (2015) que não observaram aumentos significativos na produtividade com a inoculação mista de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium*. Desse modo, a ausência de resultados positivos com a inoculação mista pode ser atribuída a características intrínsecas de cada cultivar, além de fatores edáficos.

Ainda que não se tenha verificado efeito direto sobre os componentes de produção, a inoculação mista pode auxiliar nos mecanismos de tolerância das plantas via contribuição em rotas alternativas de síntese de compostos do metabolismo secundário por exemplo. Contudo, novas pesquisas são necessárias para avaliar individualmente as respostas de cultivares com diferentes características morfológicas e de que forma os efeitos podem se manifestar do ponto de vista fisiológico relacionado aos mecanismos de tolerância.

4. CONCLUSÕES

A inoculação mista via semente proporcionou aumento na altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea, número e peso fresco de nódulos para as cultivares M 8372 IPRO e M 7739 IPRO, sendo os melhores resultados com as concentrações de 200.000 a 300.000 células de *A. brasilense* por semente.

A cultivar BMX 9086 IPRO de ciclo tardio não apresenta resposta à inoculação mista para as variáveis analisadas.

A resposta positiva da inoculação mista é mais evidente em cultivares de soja de ciclo precoce e médio em condições adversas de umidade do solo, contudo, se mostrou ineficiente para os componentes de produção.

O déficit hídrico do solo afeta a altura de planta, área foliar, massa seca da parte aérea, peso de cem grãos e número de nódulos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B. J.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P. J.; URQUIAGA, S. Fixação Biológica de Nitrogênio e Fertilizantes Nitrogenados no Balanço de Nitrogênio soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 3, p. 449- 456, 2006.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. **Estimativa do número de células de rizóbio no solo e no inoculante por infecção em planta**. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., eds. Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola. Brasília, Embrapa, 1994. p. 63-94, 1994.
- ARAÚJO, S. C. **Inoculação da soja: uma prática altamente rentável**. Informações Agrônomicas Nº 87, Setembro de 1999.
- BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C. M.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Produtividade da soja em resposta á inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2009.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Bacteria/Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, v.1, p. 103-115, 2005.
- BASSO, S. M. S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. e *Lotus* L.** 1999. 268 f. Tese (Doutorado em Zotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BENINTENDE, S.; W. UHRICH, M. HERRERA, F. GANGGE, M. STERREN Y M. BENINTENDE. Comparación entre coinoculación com *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. **Agriscientia**, v.27, n.2, p. 71-77, 2010.
- BONFIM – SILVA, E. M.; SILVA, T. J. A. da; CABRAL, C. E. A.; KROTH, B.E.; REZENDE, D. Desenvolvimento inicial de gramíneas submetidas ao estresse hídrico. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.24, n.2, p.180-186, 2011.
- BULEGON, L. G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V. F.; BATTITUS, A. G.; INAGAKI, A.M. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida a inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, v. 34 p. 169-176, 2016.
- BURDMANN, S.; HAMAOU, B.; OKON, Y. Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. **The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology**. Israel: The Hebrew University of Jerusalem, p. 145-152, 2000.

CHALK, P.M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by 15N dilution. **Plant and Soil**, n.328, p.1-16, 2010.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n. 407, p. 2365-2384, 2004.

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**, Irvine, v. 6, n.10, p. 1641-1649, 2015.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento**, Julho 2016. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_11_17_36_02_boletim_graos_julho_2016.pdf . Acesso em 20 de Julho de 2016.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; JULIANA ARAUJO ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.10, n.19; p. 1679, 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FIGUEIREDO M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 23, p. 187-193, 2007.

FIGUEIREDO, S. L.; PIVETTA, L. G.; MACHADO, F. R.; GUIMARÃES, V. F. Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. **Revista Ceres**, Viçosa, v.58, n.3, p. 342-349, 2011.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977.

FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; SACOMAN, A.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B. **Manejo do solo para redução das perdas de produtividade pela seca**. Embrapa Soja. Documentos, n.314, 2009.

GERMAN, M.A.; BURDMAN, S.; OKON, Y. KIGEL, J. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. **Biology and Fertility of Soil**, v.32, p.259-264, 2000.

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. **Revista Agrarian**, v.5, n.15, p. 36-46, 2012.

GOORMACHTING, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. **Trends in Plant Science**. v.9 p.518-522, 2004.

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

LAWLOR, D. W.; TEZARA W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany** v.103 p. 561-579, 2009.

MACHADO, D. M.; SCHOSSLER, T. R.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; PIAULINO, A. P. Atividades microbianas e as transformações no ciclo dos elementos no solo, Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012.

MANFRON, P. A.; DOURADO NETO, D.; PEREIRA, A. R. BONNEACARRERE, R. A. G.; MEDEIROS, S. L. P.; PILAU, F. G. Modelo do índice de área foliar da cultura do milho. **Revista Brasileira Agrometeorologia**, Rio de Janeiro, v.11, p.333-342, 2003.

PETTER, F. A.; ALVES, A. U.; SILVA, J. A.; CARDOSO, E. A.; ALIXANDRE, T. F.; ALMEIDA, F.A; PACHECO, L. P. Produtividade e qualidade de sementes de soja em função de doses e épocas de aplicação de potássio. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 89-100, 2014.

PETTER, F. A., PACHECO, L. P., ALCÂNTARA NETO, F.; SANTOS, G. G. Respostas de cultivares de soja à adubação nitrogenada tardia em solos de cerrado. **Revista Caatinga**, v. 25, n.1, p. 67-72, 2012.

PRETE, C. E. C.; NASCIMENTO JUNIOR, V. C.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica de nitrogênio em soja sob déficit hídrico**. VI Congresso Brasileiro de soja, Cuiaba-MT, 2012.

RAMBO, L.; COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; PARCIANELLO, G.; FERREIRA, F. G. Rendimento de grãos da soja em função do arranjo de plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, 2003.

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

UHRICH, W.; BENINTENDE, S. Aplicación de *Azospirillum brasilense* en cultivo de soja en co-inoculación com *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Científica Agropecuária**, v.9, n.1 p. 71-75, 2005.

VIEIRA, F. C.; SANTOS JUNIOR, C. D.; NOGUEIRA, A. P. O.; DIAS, A. C. C.; HAMAWAKI, O. T.; BONETTI, A. M. Aspecto fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por PEG 6000. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.2, p. 543-552, 2013.

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 SCAP**, v.38 n.1 p. 87-93, 2015.

CAPÍTULO II

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DA SOJA À INOCULAÇÃO MISTA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as respostas fisiológicas da soja e o suprimento de nitrogênio em função da inoculação mista de *Azospirillum brasilense* com *Bradyrhizobium japonicum* via semente, em condição normal e de déficit hídrico do solo. O experimento foi realizado em ambiente protegido, em área experimental da Universidade Federal do Piauí, na safra 2015/2016. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 x 2, sendo os fatores constituídos por cinco concentrações de *A. brasilense* (0; $1,5 \times 10^5$; $2,0 \times 10^5$; $2,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ células/sementes associado com $1,2 \times 10^5$ células/semente de *B. japonicum*), dois cultivares de soja, sendo um de ciclo tardio Brasmax 9086 IPRO e um de ciclo médio Msoy 8372 IPRO; dois regimes hídricos (condições adequadas de umidade e déficit hídrico do solo) com oito repetições. Foi determinado a fotossíntese líquida (*A*), taxa de condutância estomática de CO₂ foliar (*g_s*), taxa de transpiração foliar (*E*), déficit de pressão de vapor (*DPV*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), eficiência de uso da água (*EUA*), conteúdo hídrico foliar (*CHF*), teor de prolina e acúmulo de nitrogênio (N) nas folhas. A inoculação mista de *B. japonicum* e *A. brasilense* não interfere nas respostas fisiológicas (*A*, *g_s*, *E*, *DPV*, *C_i*, *EUA* e *CHF*), concentração de prolina e acúmulo de N em cultivares de soja e não atenua o efeito deletério do déficit hídrico sobre esses parâmetros. Os efeitos da limitação hídrica nos processos fisiológicos e acúmulo de N se manifestaram com maior intensidade na cultivar de ciclo menor.

Palavras-chaves: *Glycine max*, co-inoculação, fotossíntese, acúmulo de nitrogênio, condição hídrica.

**PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF SOYBEAN TO INOCULATION MIXED
WITH *BRADYRHIZOBIUM* AND *AZOSPIRILLUM BRAZILENSE***

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physiological responses of soybeans and nitrogen supply due to the mixed inoculation of *Azospirillum brasilense* with *Bradyrhizobium japonicum* via seed in normal condition and soil water deficit. The experiment was conducted in a protected environment in the experimental area of the Universidade Federal do Piauí, in the 2015/2016 crop. The experimental design was completely randomized in a factorial 5 x 2 x 2, and the factors consisted of five *A. brasilense* concentrations (0, $1,5 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ and $3,0 \times 10^5$ cells / seed associated with $1,2 \times 10^5$ *B. japonicum* cells / seed), two soybean cultivars, with a late cycle Brasmax 9086 IPRO and an average cycle Msoy 8372 IPRO; two water regimes (suitable conditions of moisture and soil water deficits) with eight replications. Although the design has been triple factorial, statistical analysis was performed as a double factor, as the cultivars were not compared because they are of different cycles. It has been determined net photosynthesis (A), conductance rate stomatal leaf CO₂ (g_s), leaf transpiration rate (E), vapor pressure deficit (VPD), intercellular CO₂ concentration (C_i), water use efficiency (WUE), leaf water content (LWC), proline content and accumulation of nitrogen (N) in the leaves. The mixed inoculation of *B. japonicum* and *A. brasilense* does not interfere with physiological responses (A, g_s, E, VPD, C_i, US and LWC), proline concentration and N accumulation in soybean cultivars and does not attenuate the deleterious effects of water deficit on these parameters. The effects of water limitation in the physiological processes and N accumulation manifested with greater intensity in shorter cycle cultivars.

Keywords: *Glycine max*, co-inoculation, photosynthesis, nitrogen accumulation, water condition.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a área cultivada com soja [*Glycine max* (L.) Merrill] encontra-se em franco processo de expansão com área cultivada na safra 2015/2016 de aproximadamente 33,2 milhões de hectares (Conab, 2016). Esse crescimento da área cultivada vem acompanhado do aumento na demanda de fertilizantes em especial os fosfatados e potássicos, visto que, o nitrogênio (N) em sua maior parte é fornecido via simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

Embora a fixação biológica via simbiose (FB) com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* seja a principal fonte de N para a cultura da soja, em condições de alta produtividade as quantidades de N via FB podem não ser suficientes para atender uma demanda da cultura que pode chegar a 300 kg ha⁻¹ (Lamond e Wesley, 2001). Em condições tropicais as quantidades médias de N fornecidas via FB na cultura da soja é de aproximadamente 190 kg ha⁻¹ (Alves et al., 2006;). Assim, considerando a necessidade de 80 kg ha⁻¹ de N para cada tonelada de grãos de soja produzida (Hungria et al., 2001) e uma produtividade média de 3.000 kg ha⁻¹, a demanda seria de aproximadamente 240 kg ha⁻¹ de N.

O fornecimento da diferença entre o N via FB e a demanda necessária pela cultura deve vir do solo, que tem como principal fonte desse nutriente a matéria orgânica (MOS). Contudo, a capacidade de fornecimento de N pela MOS é altamente variável e dependente de vários fatores que são inerentes a própria MOS (ex. quantidade e qualidade), edáficos (ex. textura e atividade biológica) e climáticos (ex. precipitação e temperatura). De maneira geral, os solos de cerrado fornecem em média 20 a 40 kg ha⁻¹ de N (Chueiriet al., 2005) durante o ciclo da cultura da soja.

Portanto, em um cenário de alta produtividade da soja, o suprimento de N pode não ser totalmente atendido mediante a fixação biológica e fornecimento do solo como reportado por Petter et al. (2012). Esse fato se agrava em solos arenosos e com baixos teores de matéria orgânica, visto que as perdas de N por lixiviação, principalmente na forma de nitrato (NO₃⁻) são mais evidentes (Correa et al., 2006; Mendes et al., 2015). Embora a utilização de fertilizantes nitrogenados pudesse suprir a demanda de N nessas condições, seu uso na cultura da soja apresenta resultados divergentes e ainda é economicamente inviável (Mendes et al., 2008; Petter et al., 2012; Fipke et al., 2016). Nesse sentido, novas técnicas de manejo devem ser estudadas visando o suprimento

adequado de N na cultura da soja, em especial para condições de alta produtividade e/ou condições climáticas adversas como baixa precipitação.

Importante destacar que na região do cerrado períodos de veranicos são comumente verificados, fato esse que pode afetar ainda mais a capacidade de fornecimento de N via FB. Diante disso, recentemente tem se estudado a técnica da inoculação mista (Zuffo et al., 2015; Bulegon et al., 2016; Fipke et al., 2016), que consiste em combinações de microrganismos simbióticos que apresentam capacidade de fixar N com microrganismos associativos, principalmente do gênero *Azospirillum* que apresentam capacidade de induzir à síntese de hormônios vegetais. Contudo os resultados envolvendo essa prática têm mostrado divergentes, indicando efeitos de condições edafoclimáticas especificadas para cada região.

Assim, partimos da hipótese de que a inoculação mista de microrganismos simbióticos (*Bradyrhizobium*) com associativos (*Azospirillum*) na cultura da soja pode mitigar os efeitos negativos no suprimento de N via FB em condições climáticas adversas como períodos de estiagem (veranicos) e melhorar a atividade fotossintética das plantas. Para tanto, conduzimos um trabalho visando elucidar os efeitos dessa técnica no suprimento de N e nas respostas fisiológicas da cultura da soja em condições de déficit hídrico na região do cerrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo

O experimento foi realizado em ambiente protegido na área experimental do Campus da Universidade Federal do Piauí – UFPI em Bom Jesus-PI (09° 04'28" de latitude Sul, 44° 21'31" de longitude Oeste e com altitude média de 277 m), na safra 2015/2016. O clima da região é tipo Aw segundo a classificação climática global de Köppen, com duas estações bem definidas, sendo uma seca que vai de maio a setembro e outra de chuvosa que vai de outubro a abril. Os dados climáticos foram coletados diariamente, no interior do ambiente protegido.

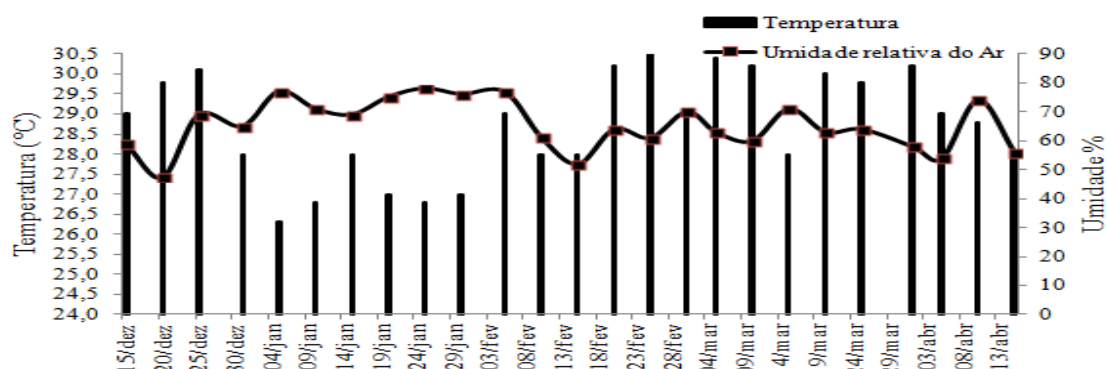


Figura 1. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a execução do experimento. Bom Jesus-PI, 2016.

O solo foi coletado em área de produção de soja em Bom Jesus na camada de 0-20 cm, com populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* por inoculações em anos anteriores, apresentando, no mínimo, $3,57 \times 10^3$ células de *Bradyrhizobium* g^{-1} de solo, determinada pelo método do número mais provável (NMP), conforme metodologia de Andrade; Hamakawa (1994). Foi realizada a análise química do solo anterior ao cultivo, e a adubação realizada conforme o resultado da análise apresentada na Tabela 1 tendo como parâmetro a recomendação para solos de cerrado.

Tabela 1. Composição química do solo coletado na camada (0-20 cm), antes da instalação do experimento em Bom Jesus - PI, safra 2015/2016.

pH	P (Mehlich)	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ²⁺	H+Al
H ₂ O	-----mg dm ⁻³ -----		-----cmol _c dm ⁻³ -----			
5,1	27,29	87,00	1,53	0,75	0,00	2,48
SB	CTC	V	M.O	Argila	Silte	Areia
-----cmol _c dm ⁻³ -----		-----%-----				
2,50	4,98	50,23	1,41	10,1	11,0	78,9

SB - soma de bases; CTC - capacidade de troca de cátions a pH 7,0; V - saturação por bases; MO – matéria orgânica.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 x 2, sendo constituídos por cinco concentrações de *Azospirillum brasilense* (0; $1,5 \times 10^5$; $2,0 \times 10^5$; $2,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ células/sementes combinado com $1,2 \times 10^5$ células/semente de *Bradyrhizobium japonicum.*), dois cultivares de soja, sendo um de ciclo tardio Brasmax 9086 IPRO e um de ciclo médio Msoy 8372 IPRO; dois regimes hídricos (condições adequadas de umidade e déficit hídrico do solo), perfazendo 20 tratamentos com oito repetições.

As sementes das cultivares foram previamente tratadas com o fungicida Carbendazin + Thiran. Foi utilizado o inoculante líquido com *Bradyrhizobium japonicum* contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 na concentração de 5×10^9 células viáveis por ml e as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilense* (2×10^8 células viáveis por ml). O cálculo de número de células por semente foi realizado conforme Araujo (1999). As sementes foram co-inoculadas a sombra e em seguida plantadas em vasos, com capacidade de 8 dm³. A semeadura dos cultivares foi realizada no dia 14 dezembro, semeando quatro sementes por vaso, com posterior desbaste, deixando apenas duas plantas.

Aos 20 dias após a emergência foi aplicado à condição de déficit hídrico, simulando um período de estiagem (veranico) de 21 dias. O controle de umidade do solo foi determinado da seguinte forma: a) determinou-se o peso dos vasos na capacidade de campo (CC) por meio da metodologia adaptada de Bonfim-Silva et al, (2011), no qual saturou-se o solo com água, deixando-os em repouso por 12 horas para escorrer a água em excesso e determinou-se o peso. Em seguida, com o valor de CC calculou-se a condição adequada de umidade de 80%, o déficit de 40% CC.

2.3 Variáveis fisiológicas avaliadas

As variáveis fisiológicas foram determinadas no tempo 0 que corresponde o final do período de déficit hídrico (DAFDH) e início da irrigação, aos 7, 14 e 21 dias DAFDH. O tempo 0 determina a condição máxima de déficit hídrico a qual a cultura foi submetida, ou seja, após 20 dias em condições de 40% de umidade do solo. Em cada época supracitada as leituras foram realizadas entre 8:00 e 11:00 horas da manhã com o auxílio de um analisador de gases por infravermelho modelo (IRGA) LI-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). As medições foram realizadas utilizando uma densidade de fluxo

de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $1.500 \mu\text{mol [quanta] m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O tempo mínimo estabelecido baseado no coeficiente de variação ($CV \leq 1,0$) foi de três minutos. Foram realizadas três leituras (sub-amostras) em cada repetição. Utilizou-se para as avaliações fisiológicas a concentração ambiental de CO_2 .

Foi avaliado por meio da determinação instantânea no terceiro trifólio basípeto das plantas na porção central da folha sem, entretanto atingir a nervura central a taxa de fotossíntese líquida (A : $\mu\text{mol [CO}_2\text{]. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s : $\mu\text{mol [CO}_2\text{]. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E : $\text{mmol [H}_2\text{O]. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), déficit de pressão de vapor (DPV : kPa), concentração intercelular de CO_2 (C_i : $\mu\text{mol [CO}_2\text{]. mol}^{-1}$). A eficiência de uso da água (EUA : $\mu\text{mol [CO}_2\text{]. mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$) foi determinado pela estabelecida entre a taxa de fotossíntese líquida e taxa de transpiração foliar utilizando a seguinte equação: $EUA = A/E$ ($\mu\text{mol [CO}_2\text{]. mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$).

A determinação do percentual de água no mesófilo foliar em relação à sua capacidade máxima de acúmulo (conteúdo hídrico foliar - CHF : %) foi determinado pela razão estabelecida entre as massas da matéria fresca (MMF), túrgida (MMT) e seca (MMS) de três fragmentos (discos) foliares de $\pm 1,0$ g retirados do terceiro trifólio basípeto das plantas na porção central da folha sem, entretanto atingir a nervura central. O CHF foi calculado pela equação: $CHF = 100[(MMF - MMS) / (MMT - MMS)]$.

A determinação de prolina (*Prolina*: $\text{mg g}^{-1} MMF$) foi realizada conforme Bates et al. (1973), sendo 0,25 g de massa seca de folhas maceradas em nitrogênio líquido sem a nervura principal, juntamente com 5 mL de ácido sulfossalicílico 3%. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm na temperatura ambiente, sendo depois coletado 1 mL de sobrenadante e transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se 1 mL de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria por 1 h a 100°C . Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo, sendo adicionados em seguida 2 mL de tolueno puro e agitado vigorosamente em vórtex, por 30 segundos, para separação das fases (o tolueno extrai a substância cromófora formando um complexo colorido avermelhado). Depois de a solução atingir a temperatura ambiente, aspirou-se a fase aquosa superior (cromóforo + tolueno), para leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

A determinação da concentração de N foliar foi realizada em pleno florescimento por meio da coleta do terceiro trifólio basípeto das plantas na porção

central da folha, que posteriormente foram secas em estufa de circulação forçada a 60°C, por 72 horas, moídas em moinho Willey equipado com peneira de malha 40 mesh, sendo à determinação do N foliar realizada pelo método analítico semimicro Kjeldahl, após digestão sulfúrica.

2.4 Análise estatística

Embora o delineamento tenha sido em esquema fatorial triplo, a análise estatística foi realizada como fatorial duplo, visto que os cultivares não foram comparados entre si, pois são de ciclos diferentes e não faz sentido compará-los principalmente porque envolve a avaliação de parâmetros biométricos. Assim, os dados dos cultivares estão apresentados de maneira separada, sem analisar a interação entre cultivares.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis significativas comparadas pelo teste Tukey utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2008). Como não houve efeito para os fatores quantitativos (ausência de efeito significativo), apresentou-se dados quantitativo referente apenas às épocas de avaliação. Assim, utilizou-se a análise com erro padrão da média visando comparar os efeitos das condições de umidade do solo em cada época para todos os parâmetros fisiológicos avaliados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da concentração intracelular de CO_2 (C_i), independentemente dos cultivares de soja (ciclo médio e tardio) e da época de avaliação dos parâmetros fisiológicos fotossíntese líquida (A), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s), taxa de transpiração foliar (E), déficit de pressão de vapor (DPV), conteúdo hídrico foliar (CHF), teor de prolina e acúmulo de nitrogênio (N) na folha houve efeito significativo apenas para as condições de umidade do solo (Tabelas 2 e 3). A inoculação mista de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* não proporcionou alterações nas repostas fisiológicas da soja e não houve interação com as condições de umidade do solo. Esses resultados corroboram os obtidos por Bulegon et al. (2016) que também não verificaram efeito da inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* aplicados via semente ou no sulco de plantio sobre as trocas gasosas na cultura da soja durante o período vegetativo.

Ao final do período de déficit hídrico (0 DAFDH), ou seja, após 20 dias de umidade do solo próximo a 40% da capacidade de campo verificou-se maior A , E e g_s com o solo em condições não limitantes de umidade (~80% da capacidade de campo) (Figura 2). Nesse momento os valores de A , E e g_s nos dois cultivares de soja em condições adequadas de umidade do solo foram em média 60%, 63% e 62% maior respectivamente, comparado à condição de déficit hídrico. Tal fato, e como já esperado, evidencia o efeito deletério da limitação hídrica sobre a capacidade fotossintética, taxa de transpiração foliar e conseqüentemente a capacidade de trocas gasosas das plantas de soja, afetando assim o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Tabela 2. Análise de variância (valores de F) para as variáveis: fotossíntese líquida (A : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E : $\text{mmol} [\text{H}_2\text{O}].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), déficit de pressão de vapor (DPV : kPa), concentração intercelular de CO_2 (C_i : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2].\text{mol}^{-1}$), eficiência de uso da água (EUA : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2]. \text{mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$), conteúdo hídrico foliar (CHF : %), teor de prolina (*Prolina*: mg g^{-1} MF) e acúmulo de nitrogênio (N) (g planta^{-1}) em função da inoculação mista de *Azospirillum brasilense* e condição hídrica no cultivar de soja Brasmax 9086 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016.

Causas da Variação	Valores de F									
	0 DAFDH									
	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	1,80 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,89 ^{ns}	4,47 ^{ns}	2,61 ^{ns}	0,34 ^{ns}	1,84 ^{ns}	1,53 ^{ns}	0,58 ^{ns}	
Condição Hídrica (CH)	27,63 ^{**}	17,64 ^{**}	18,73 ^{**}	46,85 ^{**}	3,73 ^{ns}	3,35 [*]	24,41 ^{**}	5,87 [*]	5,36 [*]	
I x CH	1,10 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,77 ^{ns}	2,64 ^{ns}	2,39 ^{ns}	1,56 ^{ns}	2,69 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,97 ^{ns}	
CV (%)	6,26	5,51	12,3	11,6	5,47	7,05	8,65	7,86	5,89	
7 DAFDH										
	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	1,28 ^{ns}	1,69 ^{ns}	1,65 ^{ns}	0,61 ^{ns}	2,72 ^{ns}	0,41 ^{ns}	-	-	-	
Condição Hídrica (CH)	13,34 ^{**}	11,83 ^{**}	12,44 ^{**}	5,30 ^{ns}	3,08 ^{ns}	2,55 ^{ns}	-	-	-	
I x CH	0,98 ^{ns}	1,60 ^{ns}	1,23 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,87 ^{ns}	2,26 ^{ns}	-	-	-	
CV (%)	11,0	10,6	6,97	6,78	10,7	6,05	-	-	-	
14 DAFDH										
	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	3,96 ^{ns}	1,54 ^{ns}	1,56 ^{ns}	1,07 ^{ns}	1,80 ^{ns}	0,51 ^{ns}	-	-	-	
Condição Hídrica (CH)	34,17 ^{**}	32,06 ^{**}	62,52 ^{**}	4,58 ^{ns}	2,84 ^{ns}	1,95 ^{ns}	-	-	-	
I x CH	3,13 ^{ns}	1,36 ^{ns}	0,37 ^{ns}	2,29 ^{ns}	2,21 ^{ns}	0,56 ^{ns}	-	-	-	
CV (%)	10,7	8,98	8,61	10,4	4,87	9,12	-	-	-	
21 DAFDH										
	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	1,23 ^{ns}	1,84 ^{ns}	2,34 ^{ns}	1,07 ^{ns}	1,38 ^{ns}	0,83 ^{ns}	-	-	-	
Condição Hídrica (CH)	13,59 ^{**}	12,22 ^{**}	14,81 ^{**}	4,72 ^{ns}	3,00 ^{ns}	1,75 ^{ns}	-	-	-	
I x CH	1,95 ^{ns}	1,06 ^{ns}	1,41 ^{ns}	1,82 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,56 ^{ns}	-	-	-	
CV (%)	9,02	5,79	6,95	10,5	8,76	5,90	-	-	-	

^{ns} não significativo; * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro respectivamente pelo teste F. CV: coeficiente de variação experimental. Valores médios ($n = 4$ repetições). DAFDH: dias após o final do déficit hídrico. *CHF* e *Prolina* foram determinados apenas ao final do período de déficit hídrico. *N* foi determinado no florescimento.

Tabela 3. Análise de variância (valores de F) para as variáveis: fotossíntese líquida (A : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2] \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), taxa de condutância estomática de CO_2 foliar (g_s : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2] \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E : $\text{mmol} [\text{H}_2\text{O}] \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), déficit de pressão de vapor (DPV : kPa), concentração intercelular de CO_2 (C_i : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2] \cdot \text{mol}^{-1}$), eficiência de uso da água (EUA : $\mu\text{mol} [\text{CO}_2] \cdot \text{mmol}^{-1} [\text{H}_2\text{O}]$), conteúdo hídrico foliar (CHF : %), teor de prolina (*Prolina*: mg g^{-1} MF) e acúmulo de nitrogênio (N) (g planta^{-1}) em função da inoculação mista de *Azospirillum brasilense* e condição hídrica no cultivar de soja Msoy 8372 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016.

Causas da Variação	Valores de F								
	0 DAFDH								
	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>
Inoculação mista (I)	0,31 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,44 ^{ns}	1,73 ^{ns}	2,02 ^{ns}	0,34 ^{ns}
Condição Hídrica (CH)	11,79 ^{**}	4,54 [*]	4,45 [*]	14,16 ^{**}	1,67 ^{ns}	1,71 ^{ns}	10,72 [*]	5,19 [*]	4,56 [*]
I x CH	2,49 ^{ns}	2,49 ^{ns}	3,10 ^{ns}	1,61 ^{ns}	0,35 ^{ns}	2,84 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,93 ^{ns}	1,02 ^{ns}
CV (%)	10,3	6,74	5,04	8,51	8,08	6,95	10,6	5,80	7,89
7 DAFDH									
<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	2,69 ^{ns}	2,46 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,54 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,94 ^{ns}	-	-	-
Condição Hídrica (CH)	17,02 [*]	12,02 ^{**}	19,15 ^{**}	4,39 ^{ns}	0,22 ^{ns}	2,14 ^{ns}	-	-	-
I x CH	1,37 ^{ns}	1,87 ^{ns}	1,99 ^{ns}	2,22 ^{ns}	0,95 ^{ns}	1,96 ^{ns}	-	-	-
CV (%)	10,6	6,22	9,83	9,90	9,20	9,32	-	-	-
14 DAFDH									
<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	2,23 ^{ns}	1,11 ^{ns}	2,40 ^{ns}	1,57 ^{ns}	3,48 ^{ns}	0,71 ^{ns}	-	-	-
Condição Hídrica (CH)	10,34 ^{ns}	4,98 [*]	4,62 [*]	4,57 ^{ns}	0,24 ^{ns}	4,25 [*]	-	-	-
I x CH	0,71 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,84 ^{ns}	2,40 ^{ns}	0,88 ^{ns}	-	-	-
CV (%)	8,66	8,94	11,3	7,79	7,80	8,66	-	-	-
21 DAFDH									
<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	<i>DPV</i>	C_i	<i>EUA</i>	<i>CHF</i>	<i>Prolina</i>	<i>N</i>	
Inoculação mista (I)	0,77 ^{ns}	3,01 ^{ns}	3,63 ^{ns}	0,56 ^{ns}	1,65 ^{ns}	0,67 ^{ns}	-	-	-
Condição Hídrica (CH)	18,33 ^{**}	25,67 ^{**}	29,12 ^{**}	4,29 ^{ns}	1,95 ^{ns}	2,05 ^{ns}	-	-	-
I x CH	3,11 ^{ns}	7,11 ^{ns}	8,09 ^{ns}	1,44 ^{ns}	0,32 ^{ns}	1,96 ^{ns}	-	-	-
CV (%)	8,10	8,13	9,65	10,8	9,07	6,90	-	-	-

^{ns} não significativo; * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro respectivamente pelo teste F. CV: coeficiente de variação experimental. Valores médios ($n = 4$ repetições). DAFDH: dias após o final do déficit hídrico. *CHF* e *Prolina* foram determinados apenas ao final do período de déficit hídrico. *N* foi determinado no florescimento.

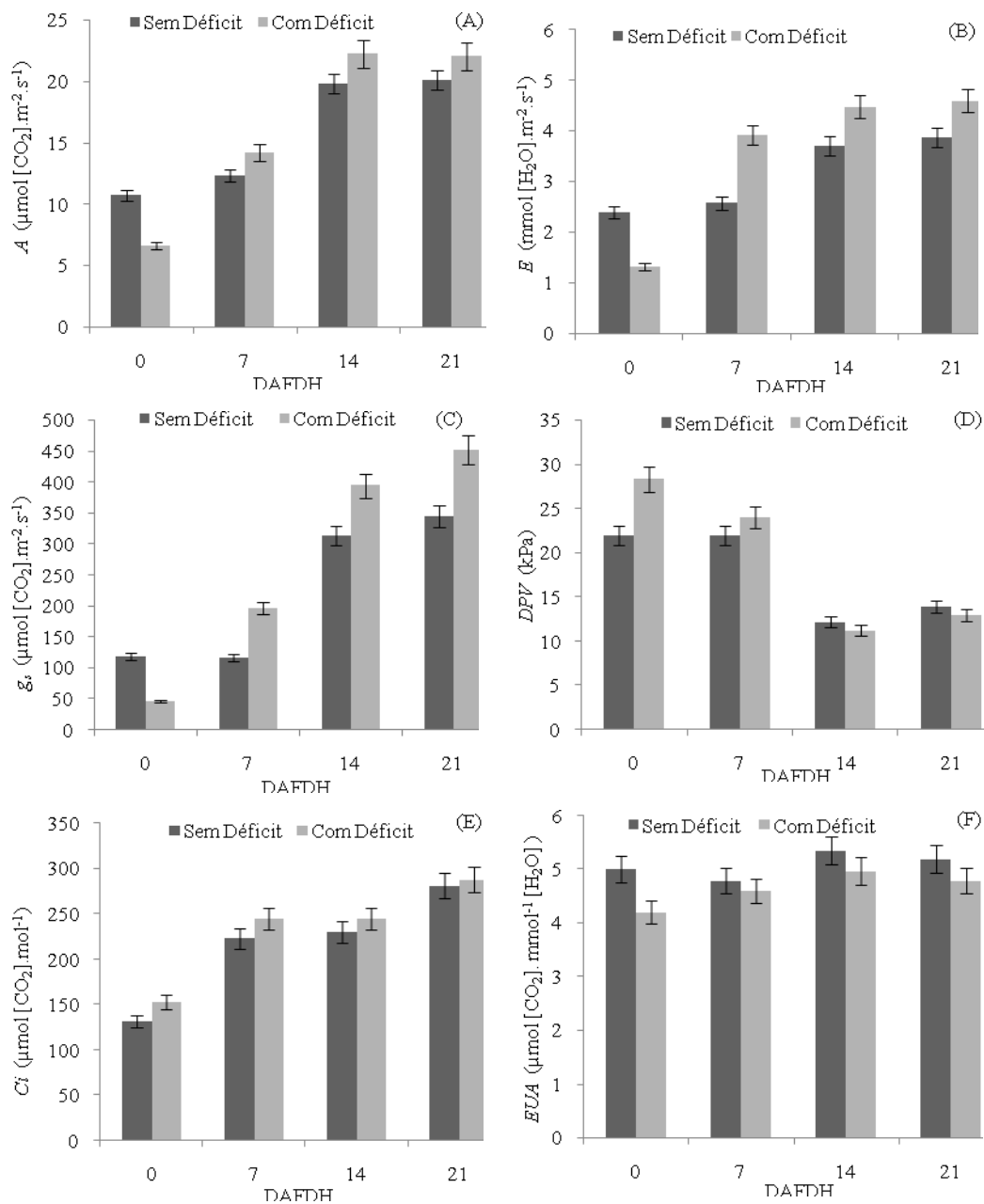


Figura 2. Fotossíntese líquida (A), taxa de transpiração foliar (E), taxa de condutância estomática (g_s), déficit de pressão de vapor (DPV), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência de uso da água (EUA) em função da condição hídrica no cultivar de soja Brasmax 9086 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. DAFDH – dias após o fim do déficit hídrico.

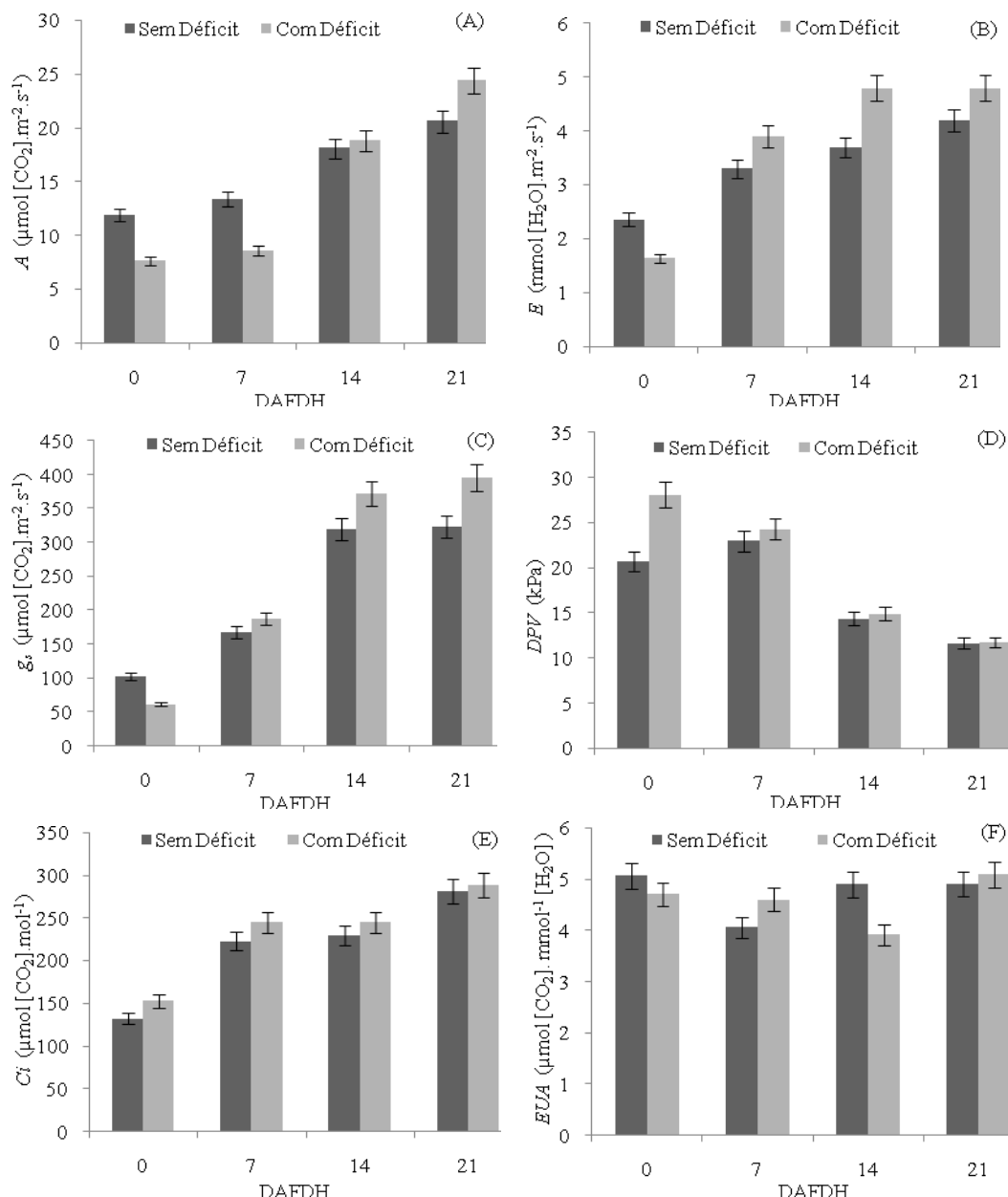


Figura 3. Fotossíntese líquida (*A*), taxa de transpiração foliar (*E*), taxa de condutância estomática (g_s), déficit de pressão de vapor (*DPV*), concentração intercelular de CO_2 (*C_i*) e eficiência de uso da água (*EUA*) em função da condição hídrica no cultivar de soja Msoy 8372 IPRO, em Bom Jesus-PI, 2016. DAFDH – dias após o fim do déficit hídrico.

A redução da *A* em condições de déficit hídrico é consequência do fechamento estomático (redução da difusão de CO_2), fato esse comprovado pela redução da *E* e g_s . Esse efeito é uma resposta fisiológica da planta visando limitar a perda de água (Fioreze et al., 2013). Contudo, esses efeitos foram reversíveis em que, após a retomada da irrigação e retorno às condições ideais de umidade do solo a *A*, *E* e g_s das plantas de soja voltaram a crescer em patamares semelhantes e até maiores comparado às plantas

que estavam sempre em condições ideais de crescimento e desenvolvimento. Isso demonstra que a recuperação da soja após um período de estresse hídrico significativo é plenamente reversível e não compromete a capacidade fotossintética nos períodos subsequentes. Esses resultados são importantes visando subsidiar novas pesquisas em melhoramento com o propósito de se estudar novas técnicas que atenuam os efeitos dessas condições durante os períodos de limitação hídrica (veranicos).

Importante destacar que o *CHF* ao final do período de déficit hídrico não reduziu nas mesmas proporções da atividade metabólica das células (*A*, *E* e *g_s*) (Figura 4), ou seja, a manutenção da turgescência das células mesmo que em níveis menores proporcionou a síntese de compostos relacionados à proteção celular, como ex. o aminoácido prolina (Figura 5). Nessas condições a concentração de prolina aumentou em 74% e 54% para os cultivares de ciclo médio e tardio respectivamente. Assim, a recuperação e a maior atividade fisiológica instantânea nas células comprovam a eficiência do mecanismo protetor das células das plantas em condições de déficit hídrico. Esse mecanismo está relacionado principalmente à elevada síntese de prolina e/ou redução da oxidação de prolina já existente, conferindo a integridade celular decorrente da manutenção da estabilidade da membrana plasmática, de proteínas e enzimas em condições de déficit hídrico (Ashraf et al., 2011; Filippou et al., 2014).

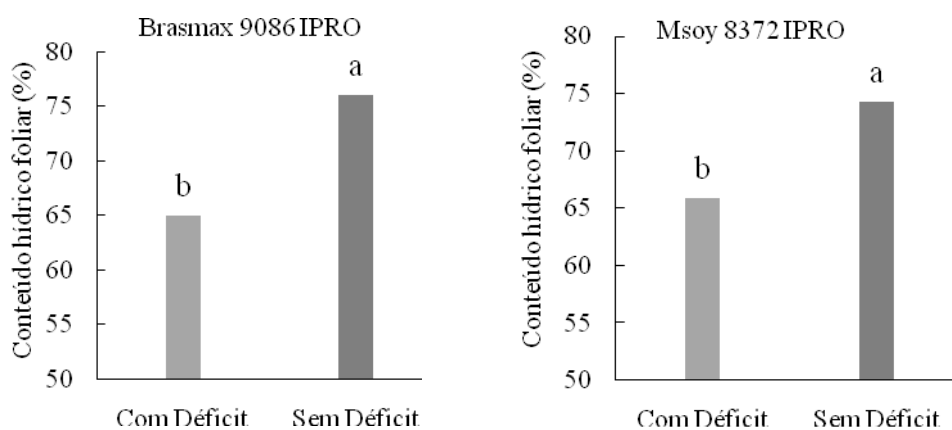


Figura 4. Conteúdo hídrico foliar em cultivares de soja ao final do período de submissão ao déficit hídrico (20 dias) e em condições adequadas de umidade do solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016. Letras diferentes diferem entre si de forma significativa pelo teste Tukey a 1%.

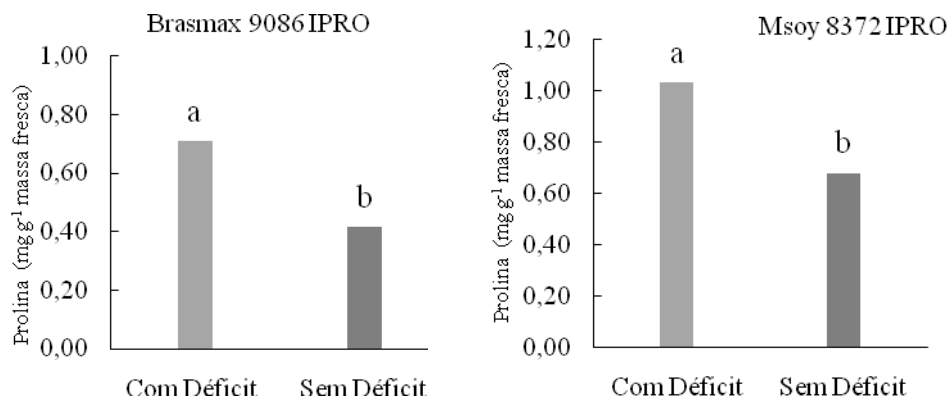


Figura 5. Teor de prolina foliar em cultivares de soja ao final do período de submissão ao déficit hídrico (20 dias) e em condições adequadas de umidade do solo, em Bom Jesus, safra 2015/2016. Letras diferentes diferem entre si de forma significativa pelo teste Tukey a 5%.

Posteriormente, com a reposição do conteúdo hídrico foliar a atividade metabólica celular volta ao normal. Contudo, o crescimento e desenvolvimento das plantas durante o período de déficit hídrico é prejudicado e as plantas não compensam essa defasagem nos períodos posteriores. Logo, o lapso temporal de ocorrência do veranico governa as respostas quanto ao desempenho agrônomo da soja ao final do ciclo, como o acúmulo de fitomassa, altura de plantas, número de vagens e produtividade. Portanto, quanto maior o período de déficit hídrico maior os efeitos deletérios para o crescimento e desenvolvimento das plantas, visto que, os mecanismos protetores desencadeados durante o período de déficit hídrico geram custos metabólicos/energéticos para as células devido a síntese de solutos orgânicos (Lima et al., 2004), resultando no desvio de rotas metabólicas, reduzindo assim o substrato base (NADPH^+ e FADH^+) para o processo de síntese de ATP celular.

A capacidade de manutenção em parte da turgescência verificado pelo *CHF* é comprovado pelo *DPV*, que de maneira análoga não aumentou em níveis proporcionais à redução das trocas gasosas (*A*, *E* e *g_s*) (Figura 2 e 3). O aumento do *DPV* ao final do período de déficit hídrico foi ~27% superior à condição não limitante de umidade do solo. Embora o *DPV* possa governar a *E* e conseqüentemente a *g_s* a menor redução do *CHF* permite uma menor diferença entre as concentrações de vapor d'água da câmara subestomática e atmosfera, resultando em baixa relação $DPV_{\text{folha-ar}}$. Isso permite que ocorram trocas gasosas que viabilizam a atividade metabólica em níveis que não levam ao colapso hídrico e conseqüentemente ao ponto de murcha permanente em curtos períodos de déficit hídrico.

A *Ci* não foi afetada pelas condições de umidade do solo e pela inoculação mista (Figura 2 e 3). Verifica-se efeito apenas nas concentrações de CO₂ em função do tempo, sendo que após 7 DAFDH que coincide com o período de maior acúmulo de fitomassa seca e *A*. Esse fato é importante a medida que sua redução seria indicativo de limitação na taxa de assimilação de carbono decorrente da redução de *g_s*, que restringiria a difusão do CO₂ para o interior do mesófilo foliar. Portanto, é evidente que mesmo em condições de limitação hídrica temporária a cultura da soja mesmo que em menores níveis consegue realizar trocas gasosas que permitem a manutenção dos níveis de CO₂ intracelular e conseqüentemente *A* suficiente para a manutenção da atividade metabólica celular. Essa manutenção celular leva à síntese de compostos osmoticamente ativos e não nocivos à célula que são em parte responsáveis pelo ajustamento osmótico que atua como estratégia de manutenção da turgescência da celular (Marijuan e Bosch, 2013; Monteiro et al., 2014).

A *EUA* instantânea ou intrínseca é definida fisiologicamente como a razão entre a taxa de assimilação de carbono e a taxa de transpiração foliar (*A/E*) (Zhao et al., 2004). Dessa maneira, as variações observadas para *EUA* já eram esperadas, pois variações significativas e com a mesma tendência foram verificadas para a taxa de assimilação líquida de carbono e transpiração. Como as variações nas taxas de assimilação líquida de carbono e transpiração foram equivalentes ao final do período de limitação hídrica e aos 7, 14 e 21 dias após o suprimento de água no solo, a *EUA* não apresentou diferença significativa durante esse período.

Assim como para os demais parâmetros, a inoculação mista de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* não proporcionou maior acúmulo de N nas folhas (Figura 6). Esse efeito foi verificado apenas em função do déficit hídrico e com resposta constante, ou seja, independentemente da dose de *Azospirillum brasilense* associado à *Bradyrhizobium*, a diferença no acúmulo de N foi semelhante. Isso demonstra a eficiência no suprimento de N oriundo da FB apenas com *Bradyrhizobium* para a cultura da soja, não necessitando de inoculação mista mesmo em condições adversas de umidade do solo.

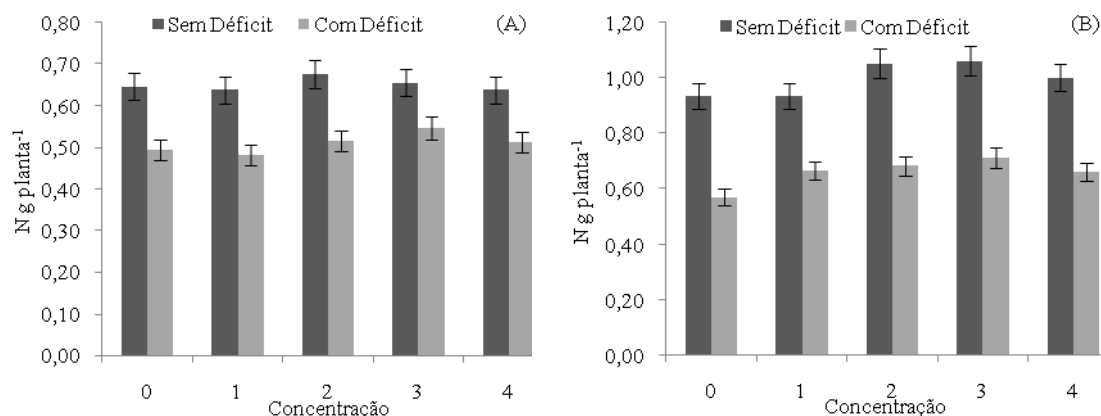


Figura 6. Acúmulo de nitrogênio (N) em dois cultivares de soja Brasmax 9086 IPRO (A) e Msoy 8372 IPRO (B) em função da inoculação mista de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* em condições normais e após 20 dias de limitação hídrica (umidade do solo em 40% da capacidade de campo). Bom Jesus – PI, safra 2015/16. Concentrações: 0= Apenas *Bradyrhizobium japonicum*; 1= $1,5 \times 10^5$; 2= $2,0 \times 10^5$; 3= $2,5 \times 10^5$; 4= $3,0 \times 10^5$ células por semente de *Azospirillum brasilense* juntamente com *Bradyrhizobium japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por semente.

A redução no acúmulo de N em função do déficit hídrico foi em média de 32% e 60% para os cultivares de ciclo tardio (Brasmax 9086 IPRO) e médio (Msoy 8372 IPRO) respectivamente. Em condições de umidade do solo abaixo de 50% da capacidade de campo é comum o aparecimento de efeitos negativos ao processo de FBN (Chalk et al., 2010). O déficit hídrico do solo desencadeia uma série de respostas fisiológicas e anatômicas nas plantas, como a diminuição da emissão de pêlos radiculares, descontinuidade da síntese de leghemoglobina e abortamento de nódulos (Goormachting et al., 2004).

O efeito mais intenso do déficit hídrico no acúmulo de N no cultivar de ciclo médio está relacionado ao menor período entre o final do déficit hídrico e o período de maior demanda de N pela cultura, que foi quando se fez a análise dos teores de N que foi de 10 dias. Esse período compreende o tempo disponível para recuperação da atividade biológica (FBN) após a retomada da irrigação e do máximo acúmulo de N para esse cultivar. Já no cultivar de ciclo tardio esse período foi de 18 dias. Esses resultados evidenciam que cultivares de ciclos menores tende a apresentar maior sensibilidade em relação à FBN em condições de déficit hídrico principalmente no período vegetativo.

Embora tenha se observado um efeito mesmo que indireto de *A. brasilense* no crescimento de raízes secundárias possivelmente em função da síntese de fitohormônios

(giberelina, auxina e citocinina) (Bashan e Bashan, 2005) e maior número de nódulos e devido ao aumento dos sítios de infecção para microrganismos nodulíficos o mesmo não se traduziu em maior eficiência na FBN e conseqüentemente maior acúmulo de N nas plantas. Tal fato está relacionado à eficiência da FB oriundo apenas de *Bradyrhizobium* em suprir o N para a cultura da soja, visto que no presente estudo a massa e número de nódulos apenas com essa inoculação proporcionou valores compatíveis com o descrito na literatura. Para Hungria et al. (2007) o peso de nódulos variando entre 0,1 a 0,2 gramas ou 10 a 30 nódulos planta⁻¹ seriam suficientes para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal.

4. CONCLUSÕES

A inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* não afeta as respostas fisiológicas (trocas gasosas) da soja comparadas à inoculação apenas com *Bradyrhizobium* e não atenua os efeitos deletérios do déficit hídrico sobre esses parâmetros.

Não há efeito da inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na síntese de prolina e manutenção do conteúdo hídrico foliar.

A inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* não proporciona maior acúmulo de nitrogênio nas folhas comparado à inoculação apenas com *Bradyrhizobium japonicum*.

Períodos de déficit hídrico (veranicos) comumente verificado no cerrado (~20 dias) afetam negativamente os processos fisiológicos e acúmulo de nitrogênio na cultura da soja, sendo os efeitos mais evidentes em cultivares de ciclo menor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B. J.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P. J.; URQUIAGA, S. Fixação Biológica de Nitrogênio e Fertilizantes Nitrogenados no Balanço de Nitrogênio soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 3, p. 449- 456, 2006.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. **Estimativa do número de células de rizóbio no solo e no inoculante por infecção em planta**. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., eds. Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola. Brasília, Embrapa, 1994. p. 63-94, 1994.
- ARAÚJO, S. C. **Inoculação da soja: uma prática altamente rentável**. Informações Agrônomicas Nº 87, Setembro de 1999.
- ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M. R. **Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients**. *Advances in Agronomy*, v.111, p.249-296, 2011.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p. 205- 207, 1973.
- BONFIM – SILVA, E. M.; SILVA, T. J. A.; CABRAL, C. E. A.; KROTH, B. E.; REZENDE, D. Desenvolvimento inicial de gramíneas submetidas ao estresse hídrico. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.24, n.2, p.180-186, 2011.
- BULEGON, L. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, Sinop, v.4, n.5, p.277-286, set./out. 2016.
- CHALK, P. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by 15N dilution. **Plant and Soil**, v.328 p.1-16, 2010.
- CHUEIRI, A. W.; PAJARA, F.; BOZZA, D. **Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja**. São Paulo: Manah, 2005. 4 p. (Informativo Técnico,169).
- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, Julho 2016**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_11_17_36_02_boletim_graos_julho_2016.pdf . Acesso em 20 de Julho de 2016.
- CORREA, R. S.; WHITE, R. E.; WEATHERLEY; A. J. **Risk of nitrate leaching from two soils amended with biosolids**. *Water Resources*, v. 33, n. 4, p. 453-462, 2006.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTL, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p.1-10, 2014.

FIORESE, S. L. RODRIGUES, J. D.; CARNEIRO, J. P. C.; SILVA, A. A.; LIMA, M. B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob deficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.11, p.1432-1439, nov. 2013.

FIPKE, G. M.; CONCEIÇÃO, G.M.; GRANDO, L. F. T. LUDWIG, R. L.; NUNES, U. R.; MARTIN, T. N. Co-inoculação com bactérias diazotróficas em soja associada a aplicação de ureia em cobertura. **Ciência e Agrotecnologia**, v.40, n.5, p.522-533, 2016.

GOORMACHTING, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. **Trends Plant Science**, v.9, p.518-522, 2004.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Circular Técnica, 35).

LAMOND, R. E.; WESLEY, T. L. In Season Fertilization for High Yield Soybean Production. **Better Crops With Plant Food**, v. 85, n. 2, p. 6-7, 2001.

LIMA, M. G. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A.; MENDES, C. R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.3, p.335-340, 2004.

MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, p.660-666, 2013.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G.; CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1053-1060, 2008.

MENDES, W. C.; ALVES JUNIOR, J.; CUNHA, P. C. R.; SILVA, A. R.; EVANGELISTA, A. W. P.; CASAROLI, D. Lixiviação de nitrato em função de lâminas de irrigação em solos argiloso e arenoso, Irriga, Botucatu, Edição Especial, **IRRIGA & INOVAGRI**, p. 47-56, 2015.

MONETIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à

putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.49, n.1, p.18-25, 2014.

PETTER, F. A.; PACHECO, L. P.; ALCÂNTARA NETO, F.; SANTOS, G. G. Respostas de cultivares de soja à adubação nitrogenada tardia em solos de Cerrado. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 67-72, 2012.

ZHAO, B.; KONDO, M.; MEDA, M.; OZAKI, Y.; ZHANG, J. Water-use eficiente and carbono isotope discrimination in two cultivares of upland rice during diferente development stages under three water regime. **Plant and Soil**, v. 261, p. 61-75, 2004.

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 SCAP**, v.38 n.1 p. 87-93, 2015.