

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Janaina de Fatima Spanevello

COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA DA SOJA

Santa Maria, RS
2023

Janaina de Fatima Spanevello

**COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA
MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Spanevello, Janaina de Fatima
COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM Bradyrhizobium
japonicum NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA
DA SOJA / Janaina de
Fatima Spanevello.- 2023.
67 p.; 30 cm

Orientador: Thomas Newton Martin
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2023

1. Agricultura sustentável 2. Bioinsumos 3. Glycine
max 4. Simbiose I. Newton Martin, Thomas II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JANAINA DE FATIMA SPANEVELLO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Janaina De Fatima Spanevello

**COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA
MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Aprovada em 06 de outubro de 2023:

Thomas Newton Martin, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr (UFSM)

Gerusa Massuquini Conceição, Dr^a (UNIJUI)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos nesta jornada, mostrando-me que nada é impossível quando temos fé e desejamos de coração.

Aos meus pais Névio e Neida Spanevello, ao meu irmão Giani Marcos Spanevello e toda a família, por permanecerem ao meu lado, apoiando e não permitindo que eu desanimasse.

Ao meu namorado Mateus Cassol Cella, obrigada por todo o incentivo, carinho e paciência nos momentos mais difíceis e presença nos momentos felizes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomas Newton Martin, pelo acolhimento no Grupo Coxilha, pela confiança depositada em mim, possibilitando que as atividades pudessem ser desenvolvidas.

Aos queridos colegas e amigos do Grupo Coxilha, Sabine Cremonese, Rosana Vey, Solange Figur, Rogério Amaral, Iuri Buligon, Renata Ehleres, Antonia Feldmann, Aline Roso, Fernando Sintra, Vitor Rumpel, Hecthor Ribas, Yago Muller, Edgar Brasil. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo acolhimento e auxílio nas atividades. Em especial as colegas Eduarda Bronzatto e Eduarda Grun que em pouco tempo se tornaram grandes amigas, obrigada pelas horas de conversa, pela troca de conhecimentos e vivências e por estarem presentes em cada passo desta conquista.

A Universidade Federal de Santa Maria, juntamente com os professores que contribuíram direta ou indiretamente para obtenção deste título.

A CAPES pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para esta realização.

RESUMO

COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA DA SOJA

AUTORA: Janaina de Fatima Spanevello

ORIENTADOR: Thomas Newton Martin

O crescimento populacional e a necessidade de produção de alimentos com segurança alimentar é um problema global. O uso de bioinsumos a base de bactérias promotoras de crescimento de plantas torna-se uma alternativa sustentável para a produção agrícola. Porém, o uso simultâneo de várias espécies de microrganismos e a falta de controle de doses do bioinsumo pode não trazer resultados benéficos para a cultura da soja. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o uso de espécies de microrganismos e doses de aplicação na coinoculação da cultura da soja. Na primeira safra, 2021/2022, foram realizados sete experimentos, utilizando os microrganismos *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhattai* e *Bacillus megaterium* em sulco de semeadura e em pulverização foliar. No segundo ano, 2022/2023, foi realizado um experimento com os melhores tratamentos do ano anterior, sendo os microrganismos aplicados em sulco de semeadura. Avaliaram-se características relacionadas ao percentual de cobertura do solo, índice de área foliar, número e massa seca de nódulos, área superficial, volume e comprimento de raízes, produtividade de grãos e massa de mil grãos, nos dois anos. Além disso, foi realizado um experimento em laboratório, em 2023, para testar as bactérias utilizadas no experimento de campo, nas condições de isolada e em combinação, sendo avaliado o crescimento da colônia bacteriana. Nas condições testadas, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento promoveu a manutenção do crescimento e desenvolvimento da planta mesmo nos dois anos com a presença de déficit hídrico. A aplicação foliar dos microrganismos não promoveu incremento para as variáveis, nas condições do estudo. Nas duas safras, os tratamentos com coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus subtilis* (2L) e *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus aryabhattai* (0,1L) foram superiores, sendo confirmado que tais combinações não obtiveram interação significativa no experimento em laboratório. Dessa forma, podem ser usadas em coinoculação na cultura da soja.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Bioinsumos. *Glycine max*. Simbiose.

ABSTRACT

COINOCULATION OF RIZOBACTERIA WITH *Bradyrhizobium japonicum* IN MITIGATION OF THE EFFECTS OF LA NIÑA IN SOYBEAN CROP

AUTHOR: Janaina de Fatima Spanevello

ADVISOR: Thomas Newton Martin

Population growth and the need to produce food with food security is a global problem. The use of bioinputs based on bacteria that promote plant growth becomes a sustainable alternative for agricultural production. However, the simultaneous use of several species of microorganisms and the lack of bioinput dose control may not bring beneficial results for the soybean crop. The objective of this research was to evaluate the use of species of microorganisms and application rates in the coinoculation of soybean crops. In the first harvest, 2021/2022, seven experiments were carried out using the microorganisms *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhattai* and *Bacillus megaterium* in sowing furrows and in foliar spraying. In the second year, 2022/2023, an experiment was carried out with the best treatments from the previous year, with the microorganisms applied in the sowing furrow. Characteristics related to the percentage of soil cover, leaf area index, number and dry mass of nodules, surface area, volume and length of roots, grain yield and mass of a thousand grains were evaluated in both years. Furthermore, a laboratory experiment was carried out, in 2023, the order to test the bacteria used in the field experiment, under isolated and combined conditions, evaluating the growth of the bacterial colony. Under the tested conditions, the application of growth-promoting bacteria promoted the maintenance of plant growth and development even in the two years with the presence of water deficit. The foliar application of the microorganisms did not promote an increment for the variables, under the conditions of the study. In both seasons, treatments with co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus subtilis* (2L) and *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus aryabhattai* (0.1L) were superior, confirming that such combinations did not have significant interaction in the laboratory experiment. Thus, they can be used in coinoculation in the soybean crop.

Keywords: Sustainable Agriculture. Bioinputs. *Glycine max*. Symbiosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Balanço hídrico e temperaturas médias do ar na área experimental durante os dois anos de cultivo da soja (safra 2021/2022 e 2022/2023). As setas indicam respectivamente a semeadura, florescimento e colheita da cultura da soja 26
- Figura 2 – Disposição das bactérias nas placas, de forma isolada (lado esquerdo) e forma combinada (lado direito) 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos experimentos do primeiro ano (campo, safra 2021/2022).....	28
Tabela 2 - Distribuição dos tratamentos do experimento 8 (campo, safra 2022/2023)	29
Tabela 3 – Contrastes entre os tratamentos testados considerando a bactéria isolada (Iso) e em combinação (Com) em placas de petri	31
Tabela 4 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl ⁻¹); massa seca de nódulos por planta (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²).....	33
Tabela 5 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); volume de raiz (VR, cm ³)	34
Tabela 6 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); comprimento de raiz (CR, cm); área superficial de raiz (AR, cm ²); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹) e massa de mil grãos (MG, g)	34
Tabela 7 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²)	35
Tabela 8 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²)	36
Tabela 9 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²);	

	número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²) ..37
Tabela 10	- Médias para as variáveis percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); número de nódulos (NN, pl) e massa seca de nódulos (MN, g)38
Tabela 11	- Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); índice de área foliar (IAF, cm ²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²)38
Tabela 12	- Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³); área superficial de raiz (AR, cm ²) 39
Tabela 13	- Médias para as variáveis: produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g)40
Tabela 14	- Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³); área superficial de raiz (AR, cm ²).....40
Tabela 15	- Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²) 41
Tabela 16	- Médias para as variáveis: produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹); número de nódulos (NN, pl) e massa seca de nódulos (MN, g).....42
Tabela 17	- Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm ²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm ³) e área superficial de raiz (AR, cm ²).....42
Tabela 18	- Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P)

para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)..43

Tabela 19 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³); área superficial de raiz (AR, cm²) 44

Tabela 20 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²) 45

Tabela 21 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²) 46

Tabela 22 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidade (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²) 47

Tabela 23 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²) 48

Tabela 24 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para crescimento da colônia bacteriana (cm²) das bactérias *Bradyrhizobium*

japonicum (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm),
Bacillus subtilis (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhatai* (Ba).
..... 49

Tabela 25 - Tabela de médias da interação entre os fatores bactéria e aplicação, para a variável
crescimento da colônia bacteriana (cm²), das bactérias *Bradyrhizobium*
japonicum (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm),
Bacillus subtilis (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhatai* (Ba)
..... 50

Tabela 26 - Tabela de médias para os efeitos principais da variável crescimento da colônia
bacteriana (cm²), para as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum*
brasilense (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas*
fluorescens (Pf), *Bacillus aryabhatai* (Ba) 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA DA CULTURA DA SOJA	14
2.2 USO DE MICRORGANISMOS NA AGRICULTURA.....	16
2.3 COMPATIBILIDADE ENTRE MICRORGANISMOS.....	19
3.1 INTRODUÇÃO.....	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1 Experimento de Campo (Safrá 2021/2022)	27
3.2.2 Experimento de Campo (Safrá 2022/2023)	28
3.2.3 Experimento de Laboratório	30
4 RESULTADOS	32
4.1 EXPERIMENTO 1	32
4.2 EXPERIMENTO 2	34
4.3 EXPERIMENTO 3	36
4.4 EXPERIMENTO 4	39
4.5 EXPERIMENTO 5	40
4.6 EXPERIMENTO 6	42
4.7 EXPERIMENTO 7	44
4.8 EXPERIMENTO 8	46
4.9 EXPERIMENTO 9	48
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERENCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Projeções recentes afirmam que até o ano de 2050 a população mundial será de 10 bilhões de pessoas, sendo necessário um aumento significativo na produção alimentos (FUKASE; MARTIN, 2020). A intensificação e a tecnificação da agricultura trouxeram avanços para alcançar altos patamares produtivos, porém quando feita de maneira descriteriosa impactam o sistema solo - planta - atmosfera, com resultados negativos percebidos até hoje (MASON et al., 2023). A escassez de terras disponíveis e o aumento de terras impróprias para cultivo, resultado da salinidade, erosão do solo, seca e resistência de pragas e doenças, são alguns impactos provocados pela ação antropogênica dos últimos anos (AERON et al., 2020). Devido a isso, buscam-se alternativas para produzir alimentos de forma eficiente, com menor custo econômico e impacto ambiental.

A soja (*Glycine max*) é uma das culturas de maior relevância mundial, sendo o Brasil o maior produtor do grão. Seu uso na indústria está ligado a fonte de vitaminas, minerais e proteínas, produção de óleos e ração animal (SWARNALAKSHMI et al., 2020). O uso de bioinsumos na cultura da soja vem se destacando como uma alternativa que possibilita aumento na produtividade de grãos de maneira sustentável, com menores danos ao ambiente e redução no custo de produção (MORETTI et al., 2020). Dentre os microrganismos utilizados está o gênero *Bradyrhizobium*, que quando inoculado em associação a leguminosas realiza a fixação biológica de nitrogênio, dispensando o uso de adubos nitrogenados. Associado a ele, em coinoculação, pode-se utilizar bactérias promotoras de crescimento, com destaque para o gênero *Azospirillum* que auxilia no crescimento radicular através da liberação de hormônios. Outras opções de bactérias que podem ser utilizadas em coinoculação é a *Pseudomonas*, que possui a capacidade de solubilizar fosfato, capturando o fósforo adsorvido ao solo e liberando às plantas e o *Bacillus* o qual sintetiza hormônios para a promoção de crescimento e compostos antibióticos que auxiliam no controle de patógenos (BARBOSA et al., 2021; ZEFFA et al., 2020).

O uso dos microrganismos em coinoculação deve ser melhor entendido, pois são organismos vivos que irão alterar a dinâmica do ambiente no qual serão inseridos. Além disso, por haver a possibilidade da produção *on farm* (produção na propriedade rural), produtores acabam usando-os de forma inadequada, não realizando controle de qualidade e nem análise da concentração do produto. Além disso, por terem baixo custo de produção e por falta de conhecimento técnico, esses produtos acabam sendo usados em doses elevadas, podendo

ocasionar resultados não satisfatórios (MAZARO et al., 2022). Tais fatores devem ser analisados e validados pela pesquisa para que sejam melhor empregados no manejo sustentável da cultura da soja. Dessa forma, objetivou-se avaliar o uso em associação das bactérias promotoras de crescimento de plantas *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense* com diferentes doses, em coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja, em condição de déficit hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA DA CULTURA DA SOJA

A população mundial está em constante crescimento, projeções recentes estimam que até o ano de 2050 alcance 10 bilhões de pessoas fazendo com que a produção de alimentos, deva aumentar em 56% a fim de satisfazer as necessidades alimentares (FUKASE; MARTIN, 2020; HELIN; WEIKARD, 2019; POVEDA; EUGUI, 2022). A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um dos alimentos chave na alimentação humana e animal, pois ela é fonte de vitaminas, minerais, proporcionando óleo e proteína vegetal a um baixo custo (SWARNALAKSHMI et al., 2020).

A soja é uma aleuroleaginosa com grande relevância no mercado internacional, sendo que na safra 2019/2020 o Brasil tornou-se o maior produtor mundial do grão (RODRIGUES et al., 2020). Seu cultivo começou no início do século 20 e sua expansão ocorreu pelo avanço científico, uso de cultivares resistentes às pragas e doenças, ao emprego de tecnologias e mecanização agrícola. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento a safra brasileira de soja de 2021/22, foi cultivada em 41.492 mil hectares, enquanto a produção atingiu 125.549.800 toneladas, já na temporada 2022/23 a área cultivada alcançou 44.031.700 hectares com produção de 155.736,5 mil toneladas de grãos, representando um aumento de 24% em relação à safra anterior (CONAB, 2023).

O avanço da industrialização da agricultura levou a um aumento significativo e essencial da produtividade. Com maior quantidade de alimentos disponíveis para uma população em crescimento, surgiram também problemas ambientais e sociais tais como: degradação do solo, expansão da fronteira agrícola, ataque de patógenos, resistência de plantas daninhas, uso massivo de defensivos agrícolas e aumento do custo dos insumos

(PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). Ademais, há uma maior exigência por parte dos consumidores, que demandam por uma agricultura com menor contaminação ambiental. O uso do solo de forma irracional causa impactos negativos em suas características físicas, químicas e biológicas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). A redução de terras próprias para uso devido a degradação é resultado da não realização de práticas conservacionistas como a rotação de culturas (STEFANOSKI et al., 2013). A expansão de novas áreas para cultivo agrícola com abundância de água e biodiversidade é limitada, estando localizada em poucos países, sendo em grande parte na América Latina (PEREIRA; CASTRO, 2022; SAATH; FACHINELLO, 2018). Países como China e Estados Unidos já não possuem áreas para ampliação da exploração agrícola (SAATH; FACHINELLO, 2018). Além disso, a cada ano, devido à mudanças climáticas, ocorrem mais perdas agrícolas devido à seca ou excesso de chuvas, com eventos naturais intensos de temperaturas extremas (KAVAMURA et al., 2013). Sendo que a baixa disponibilidade de água no solo é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento das plantas, podendo inibir a absorção de nutrientes pelas raízes (KAVAMURA et al., 2013; SUSILOWATI; PUSPITA; YUNUS, 2018).

Na atualidade, a agricultura dispõe de inúmeras tecnologias que auxiliam o produtor a atingir altos patamares produtivos. Dentre eles pode-se citar a possibilidade de irrigação, adição de insumos químicos e o melhoramento genético de cultivares (SHARMA; KUMAR, 2021). Contudo quando manejados de forma isolada essas ferramentas são insuficientes para mitigar os impactos negativos da degradação das áreas cultivadas (REZENDE et al., 2021). Além disso, a utilização de adubos minerais provém de fontes não renováveis. A extração de matéria prima para fertilizantes, como o fósforo (P), advém do fosfato de rocha, cuja disponibilidade é finita (WITHERS et al., 2018). Já o nitrogênio (N), essencial na cultura da soja é oriundo da mineralização da matéria orgânica do solo, da adubação mineral nitrogenada através da ureia (45% de N) e também das descargas elétricas, contudo, esse nutriente apresenta grande mobilidade no solo, sendo facilmente perdido por meio da volatilização ou lixiviação (ESPER NETO et al., 2021; FLORENCIO et al., 2022; SARTORI et al., 2023).

O ataque de patógenos e presença de plantas daninhas demandam uso intenso de agrotóxicos para seu controle, sendo estes muitas vezes utilizados de forma intensiva, no momento inadequado e na dose incorreta. Tal prática pode acarretar adaptações dos patógenos aos princípios ativos, fazendo com que a eficiência dos produtos disponíveis no mercado seja limitada, juntamente com a redução periódica de moléculas químicas disponíveis, o que muitas vezes acarreta em usos de produtos incorretos, resultando em poluição do solo, água, ar e alimentos (ALENGEBAWY et al., 2021; MAZARO et al., 2022; SHARMA; KUMAR,

2021). Esses fatores são uma ameaça à segurança alimentar global (REN et al., 2016). Ademais, o impacto das mudanças climáticas afetará a temperatura do ar, precipitação, velocidade do vento, alterando a dinâmica das populações. Tais mudanças podem ter efeitos diferentes no dano do patógeno, na suscetibilidade da planta e em outras características funcionais associadas às interações do patógeno com o hospedeiro (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023; YANG; REN; ZHAN, 2023). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias e estratégias que possibilitem manter altas produtividades, mas com o mínimo de alteração do meio ambiente, presando pela sustentabilidade. Podendo ser estabelecido um modelo híbrido de produção de soja, o qual mantenha o equilíbrio entre produtividade, redução de custos e sustentabilidade (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014; POVEDA; EUGUI, 2022; SAATH; FACHINELLO, 2018).

2.2 USO DE MICRORGANISMOS NA AGRICULTURA

Uma ferramenta que tem o potencial de aumentar o desenvolvimento das culturas, a um baixo custo e de forma sustentável são os bioinsumos (SCUDELETTI et al., 2023). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), bioinsumo é o produto, processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinada ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interferem positivamente no crescimento, no desenvolvimento e nos mecanismos de resposta de animais, plantas, microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (BETTIOL, 2020). Apesar do enfoque recente, o uso de microrganismos na agricultura teve início por volta de 1900 (SANTOS et al., 2021). No ano de 2019 o mercado de inoculantes do Brasil, comercializou cerca de 70 milhões de doses, principalmente para uso na cultura da soja (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Os microrganismos são agentes que fazem parte do sistema do solo, principalmente na rizosfera, região extremamente ativa que envolve o sistema radicular (AERON et al., 2020). Estes são atraídos pelos exsudatos radiculares liberados pelas plantas, que consistem em compostos de baixa e alta massa molecular, como proteínas, ácidos orgânicos, açúcares, flavonoides, mucilagens, entre outros (AHEMAD; KIBRET, 2014; FLORENCIO et al., 2022). Algumas espécies isoladas da rizosfera são denominadas como rizobactérias promotoras de crescimento, uma vez que fornecem componentes benéficos para o desenvolvimento das

plantas as quais estão associadas, mantendo assim, uma interação positiva entre planta e microrganismo (DUPUY; SILK, 2016; KUZUYAKOV; RAZAVI, 2019; SHARMA; KUMAR, 2021).

Inoculação é o nome dado ao processo de adição no sistema solo - planta, do produto que contém microrganismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). São diversos os mecanismos de ação pelos quais os microrganismos podem atuar na melhoria dos processos fisiológicos e morfológicos dos vegetais, os quais podem ser divididos em diretos e indiretos, sendo que estes variam conforme a espécie e cultura. A FBN, solubilização/mobilização de minerais, reguladores de crescimento vegetal, são considerados mecanismos diretos. Já a produção de antibióticos, enzimas líticas, compostos orgânicos voláteis, biosurfactantes, sequestro de ferro através de sideróforos, resistência sistêmica induzida são os mecanismos que promovem indiretamente o crescimento das plantas (AERON et al., 2020).

Bradyrhizobium é considerado o principal gênero no que diz respeito à associação simbiótica com a cultura da soja. Dentro deste gênero, pode-se destacar as espécies *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. diazoefficiens* que são as mais utilizadas em inoculantes comerciais (ZEFFA et al., 2020). A associação simbiótica ocorre quando a bactéria infecta as raízes de leguminosas, via pelos radiculares, formando os nódulos. Estruturas essas onde irão abrigar-se e receber da planta hospedeira proteção e alimento. Em troca, capturam o nitrogênio atmosférico (N_2) e, pela ação da nitrogenase (enzima bacteriana) reduzem a amônia (NH_3^+), que, então, é transformada em compostos nitrogenados, que são exportados e assimilados pelas células vegetais da planta hospedeira (FREITAS et al., 2022; NOGUEIRA et al., 2018). Este processo é denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (WU et al., 2023).

A planta de soja requer 83 kg de nitrogênio (N) para produzir 1000 kg de grãos. A FBN fornece todo o nitrogênio necessário, sem a necessidade de suplementação com fertilizantes minerais (HUNGRIA; MENDES, 2015; WU et al., 2023). Porém, os benefícios só são alcançados quando realizada a inoculação adequada, a qual deve fornecer bactérias na quantidade e qualidade necessárias para a simbiose, sendo de pelo menos $1,2 \times 10^6$ de unidades formadoras de colônia (UFC) por semente (HUNGRIA et al., 2017).

O *Azospirillum* promove o crescimento radicular, com o aumento do número de raízes secundárias e pelos radiculares, ampliando sua área de absorção de água, nutrientes e potencializando a FBN na soja (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2020). Além disso, o *Azospirillum* spp. tem a capacidade de produzir hormônios como auxina, citocininas, giberelinas, entre

outros componentes importantes que favorecem o crescimento e desenvolvimento das plantas (CASSÁN et al., 2020; SUMBUL et al., 2020).

O fósforo (P) é um dos elementos mais limitantes para o crescimento vegetal, sendo requerido em grandes quantidades (GOSWAMI; THAKKLER; DHANDHUKIA, 2016). Contudo, pode ser adsorvido às superfícies sólidas do solo, tornando-se indisponível às plantas. Estima-se que 95 - 99% do fósforo está em formas insolúveis, imobilizadas ou precipitadas no solo (FLORENCIO et al., 2022; GOUDA et al., 2018; GUIMARÃES; KLEIN; KLEIN, 2021). O gênero *Pseudomonas* tem a capacidade de solubilizar o fosfato, por meio da liberação de enzimas e ácidos orgânicos, disponibilizando para as plantas o P adsorvido (GARRIDO-SANZ et al., 2016; GUIMARÃES; KLEIN; KLEIN, 2021). Essa bactéria também realiza a produção de sideróforos, componentes que possibilitam a liberação de moléculas quelantes de ferro na rizosfera, servindo para atrair o elemento para próximo das raízes, facilitando sua absorção pelas plantas (GOSWAMI; THAKKLER; DHANDHUKIA, 2016). Além disso, a *Pseudomonas* disponibiliza para a planta hormônios, dentre eles a citocinina, que participa do processo de divisão celular, auxiliando no crescimento e desenvolvimento das plantas (GOSWAMI; THAKKLER; DHANDHUKIA, 2016). Também, produz compostos antibióticos como o ácido fenazina, 2,4-diacetilfloroglucinol e quitinase (GOSWAMI; THAKKLER; DHANDHUKIA, 2016; MAVRODI et al., 2007; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

O gênero *Bacillus* é o que mais possui representantes com potencial uso na promoção de crescimento, devido a sua capacidade para formação de endósporos, estruturas de resistência que possibilitam a sobrevivência mesmo em condições adversas melhorando sua viabilidade celular em produtos comerciais (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023; PARK et al., 2017). *B. aryabhatai* vem sendo empregado nas culturas agrícolas devido a sua capacidade de mitigação dos efeitos da seca e salinidade, o que ocorre por meio da formação de exopolissacarídeos, biocontrole de nematoides, produção de hormônios e disponibilidade dos nutrientes fósforo, nitrogênio e ferro (RAMESH et al., 2014; REZENDE et al., 2021; ZHAO et al., 2020). Já *B. megaterium* é usado para promoção de crescimento, produção fitohormônios e formação de biofilmes, estruturas de resistência ao estresse hídrico e salino além de aumentar a disponibilidade dos nutrientes fósforo e ferro (SUSILOWATI; PUSPITA; YUNUS, 2018). Em pesquisa desenvolvida por Chagas Junior et al. (2022), o uso de isolados de *B. subtilis* proporcionou aumento na biomassa de parte aérea e radicular, demonstrando capacidade de solubilização de fosfato e produção de fitohormônios, como o ácido indol acético.

2.3 COMPATIBILIDADE ENTRE MICRORGANISMOS

Pesquisas vem sendo desenvolvidas para avaliar a possibilidade da utilização de mais de uma espécie bacteriana, processo denominado de coinoculação. A combinação de mecanismos distintos dos microrganismos, possibilita maximizar os benefícios e otimizar a aplicação, em tempo e logística. A prática apresenta grande potencial para ser utilizada cada vez mais pelos agricultores (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

Na cultura da soja a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* é uma prática consolidada. Essa estratégia representa uma ferramenta biotecnológica para melhorar a produtividade, sem a necessidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para as práticas atuais de sustentabilidade na agricultura (DEAK et al., 2022; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015). Contudo, além dessas bactérias, tem-se realizado pesquisas, a fim de avaliar a possibilidade de utilização em conjunto de outras bactérias promotoras de crescimento vegetal (MARTIN et al., 2022).

Cada bactéria promove individualmente efeitos benéficos na cultura da soja, porém nem sempre o uso associado de vários microrganismos irá resultar em adição dos seus efeitos positivos, já que a microbiota do solo está em constante interação (BERLANGA-CLAVERO et al., 2020). Além da validação das espécies utilizadas em coinoculação, a cepa utilizada também é um fator que deve ser levado em consideração, cepas bacterianas podem combinar melhor com culturas específicas e dessa forma agir beneficiando seu desenvolvimento (MAZARO et al., 2022). Associações entre *Bradyrhizobium elkanii* e *Azospirillum brasilense* (DALOLIO et al., 2018), *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* (FERRI et al., 2017), *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* aliado a adubação com enxofre (DEAK et al., 2022), *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis* (ARAUJO et al., 2021) são exemplos de combinações sinérgicas entre microrganismos. Já Mattos (2017) observou que o tratamento de sementes somente com espécies de *Bacillus* sp. proporcionou maior produtividade de grãos em comparação com associação entre *Bacillus* spp., *Azospirillum brasilense* e o fungo *Trichoderma asperellum*.

O aplicação dos bioinsumos líquidos comumente é realizado via tratamento de sementes, sulco de semeadura ou pulverização foliar (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). E, para cada uma dessas formas de utilização é necessário um volume de calda distinto. No tratamento de semente, a dose recomendada é de 300 mL/50 kg (de sementes)

para que não comprometa a viabilidade da semente. Via sulco de semeadura o volume de calda é de no mínimo 50 L/ha, de modo que a semente e toda a região próxima dela, seja atingida com o inoculante. Já via pulverização foliar a aplicação deve ser realizada com altos volumes de calda (200 L/ha), pois busca-se atingir maior área da planta e inclusive o solo (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2020). Além disso, quando realizada a coinoculação, a dose de cada microrganismo deve ser adequada, pois cada espécie possui um tempo de crescimento e estabelecimento no ambiente.

Os avanços científicos e as inovações no controle biológico de pragas e doenças têm proporcionado o acesso do agricultor a tecnologias sustentáveis e a obtenção de produtos de qualidade com redução e/ou eliminação no uso de pesticidas. Entretanto, para que esses benefícios sejam atingidos, deve-se realizar as boas práticas de inoculação, controle de qualidade, aplicação de doses adequadas e cuidados no armazenamento. Isto para que a sobrevivência da bactéria seja assegurada e possa promover os benefícios esperados (ABHILASH et al., 2016). A produção de bioinsumos apresenta a possibilidade de fabricação *on farm* (“produção caseira” ou “produção nas fazendas”), porém apesar de já ter ocorrido melhorias neste processo, ainda há grande presença de contaminantes devido a falta de equipamentos, matéria prima e profissionais capacitados (MAZARO et al., 2022). Além disso, pela fabricação caseira, os produtos provenientes são utilizados a campo sem análise de qualidade e sem controle na aplicação. O uso de microrganismos de modo conjunto e indiscriminado, favorecido pela produção caseira ou pela indicação comercial, pode levar a um desequilíbrio na microbiota do solo e na fisiologia da planta. A inadequação técnica e ausência de etapas de controle de qualidade durante a produção dos bioinsumos podem acarretar em multiplicação de espécies ineficientes, contaminações ou até a proliferação de espécies e variedades que produzam toxinas prejudiciais às plantas e à saúde humana (ABHILASH et al., 2016; BOCATTI et al., 2022; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

A dose recomendada do inoculante a base de *Azospirillum* spp. deve ser seguida, segundo o registro no MAPA, pois pode haver a inibição do crescimento de plantas de soja, devido a liberação do hormônio ácido indol acético (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2020). A identificação da combinação de microrganismos e regulação das suas dosagens ainda é desconhecida, mas é primordial, uma vez que há grande especificidade, não sendo possível generalizar que gêneros, espécies ou cepas são compatíveis entre si (MAZARO et al., 2022). Além disso, a permanência do microrganismo na área é afetada pelo ambiente, podendo haver cooperação ou competição entre a comunidade microbiana existente (BERLANGA-

CLAVERO et al., 2020). Sendo assim, precisam-se estudos que analisem a associação entre os diferentes microrganismos e a dose dos bioinsumos aplicados na cultura da soja.

3 ARTIGO: COINOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO LA NIÑA NA CULTURA DA SOJA

Resumo: A necessidade de aumentar a produção de alimentos aliado a demanda por alternativas sustentáveis de manejo e cultivo na agricultura atual, faz com que a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal seja necessária. No entanto, o manejo de microrganismos com diferentes demandas fisiológicas e nutricionais requer desenvolvimento de tecnologias para que não prejudique a cultura de interesse. Diante disso, objetivou-se avaliar o uso e a dose de produtos à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal em coinoculação no sulco de semeadura. Para isso foram conduzidos sete experimentos de campo, no ano de 2021/2022, com o uso das espécies bacterianas *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhatai* e *Bacillus megaterium* em diversas combinações e, também de forma isolada. No segundo ano, 2022/2023 foi realizado um experimento com os tratamentos que resultaram em melhores resultados no ano anterior. Para a avaliação dos experimentos foi realizada o percentual de cobertura do solo nos estádios vegetativos V5 e V8, índice de área foliar, número e massa seca de nódulos, área superficial, volume e comprimento de raízes, produtividade de grãos e massa de mil grãos, para os dois anos. Além disso, foi realizado um experimento em laboratório a fim de testar *in vitro* as bactérias utilizadas no campo, sendo elas de forma isolada e combinada. A variável avaliada nesse experimento foi crescimento da colônia bacteriana, após oito dias de incubação. O uso de bactérias promotoras de crescimento promoveu a manutenção do crescimento e desenvolvimento da planta mesmo nos dois anos com a presença de déficit hídrico. Nas condições testadas, a aplicação foliar dos microrganismos não promoveu incremento para as variáveis. Para os dois anos de estudos os tratamentos que se destacaram foram *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus subtilis* (2L) e *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus aryabhatai* (0,1L), sendo confirmadas que não obtiveram interação significativa no experimento em laboratório. Dessa forma, podem ser usadas em coinoculação na cultura da soja.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Bioinsumo. *Glycine max*. Simbiose.

COINOCULATION OF RHIZOBACTERIA WITH *Bradyrhizobium japonicum* IN MITIGATION OF THE EFFECTS OF LA NIÑA IN SOYBEAN CROP

Abstract: The need to increase food production, combined with the demand for sustainable management and cultivation alternatives in current agriculture, makes the use of growth-promoting bacteria necessary. However, the management of microorganisms with different physiological and nutritional demands requires the development of technologies so as not to harm the culture of interest. In view of this, the objective was to evaluate the use and dose of products based on plant growth-promoting bacteria in co-inoculation in the sowing furrow. To do this, in 2021/2022, seven field experiments were conducted using the bacterial species

Bradyrhizobium japonicum, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhatai* and *Bacillus megaterium* in different combinations and also isolated. In the second year, 2022/2023, an experiment was carried out with the treatments that represent the best results in the previous year. For the evaluation of the experiments, the percentage of soil cover in the vegetative stages V5 and V8, leaf area index, number and dry mass of nodules, surface area, volume and length of roots, grain yield and mass of a thousand grains, for the two years. In addition, an experiment was carried out in the laboratory in order to test *in vitro* the bacteria used in the field, in an isolated and combined form. The variable evaluated in this experiment was the growth of the bacterial colony, after eight days of incubation. The use of growth-promoting bacteria promoted the maintenance of plant growth and development even in the two years with the presence of water deficit. In the tested conditions, the foliar application of the microorganisms did not promote an increment for the variables. For the two years of studies, the treatments that stood out were *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus subtilis* (2L) and *Bradyrhizobium japonicum* (2L) + *Bacillus aryabhatai* (0.1L), being confirmed that they did not obtain interaction significant in the laboratory experiment. Thus, they can be used in coinoculation in the soybean crop.

Keywords: Sustainable agriculture. Bioinput. *Glycine max*. Symbiosis.

3.1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a agricultura moderna é a produção de alimentos com responsabilidade social, ambiental e econômica. A produção de soja mundial vem alcançando patamares históricos, sendo o Brasil o responsável pela maior produção dessa aleuroleaginosa (RODRIGUES et al., 2020). No entanto, o uso dos recursos do solo sem a consciência de preservação e sustentabilidade, resultado da expansão agrícola do Brasil, trouxe consequências (MASON et al., 2023). A necessidade de melhor aproveitamento dos recursos presentes no solo, como a solubilização dos nutrientes fósforo, potássio, nitrogênio, ferro, ampliação de seu sistema radicular para maior captação de água e nutrientes, capacidade de aumentar a tolerância da planta aos eventos climáticos extremos que ocorrem a cada ano, como o La Niña, e conseguir transferir seus fotoassimilados para os grãos. Tais fatores aumentam a incerteza para a produção da cultura. As práticas agrícolas usadas para a remediação desses problemas, favorecem o surgimento de outros, como a erosão, o aumento da salinidade e uso excessivo de agroquímicos e fertilizantes, acabando por empobrecer o solo e selecionar patógenos e plantas daninhas resistentes aos métodos de remediação já existentes no mercado (AERON et al., 2020; MAZARO et al., 2022; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). Diante disso, o uso de produtos à base de microrganismos vem sendo uma alternativa

interessante e necessária na busca por uma agricultura sustentável (SCUDELETTI et al., 2023).

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal são um grupo de microrganismos recrutados pelas próprias plantas, através da liberação de rizodeposições. Os microrganismos utilizam estes compostos, aminoácidos, açúcares, vitaminas, flavonóides, entre outros, como alimento e em troca sintetizam e liberam componentes benéficos às plantas associadas (SANTOYO, 2022). Sua aplicação no campo, tem potencial uso na redução de fertilizantes minerais, pois pelo processo da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de nutrientes do solo, os microrganismos conseguem retirar nitrogênio atmosférico ou fósforo, ferro e outros nutrientes adsorvidos aos colóides do solo e assim disponibilizar de forma que a planta consiga metabolizar (ZEFFA et al., 2020). Além disso, realizam a proteção da planta através da liberação de compostos antimicrobianos (AERON et al., 2020). Tais atividades são promovidas por diversos microrganismos, entre eles, as bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*.

A utilização de microrganismos vem ganhando espaço no mercado agrícola, com potencial de investimento para seu uso, impulsionada pela demanda da sociedade por produtos de alta qualidade cuja produção seja realizada com baixo impacto ambiental (MORETTI et al., 2020). Cada bactéria promove efeitos positivos em inoculação, porém nem sempre o uso associado de vários microrganismos em coinoculação irá resultar na adição de seu benefícios (BERLANGA-CLAVERO et al., 2020). As coinoculações entre *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* (DEAK et al., 2022; FERRI et al., 2017), *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis* (ARAUJO et al., 2021) são exemplos de associações sinérgicas, porém Mattos (2017) observou que *Bacillus* sp. promoveu maior produtividade de grãos quando comparada a associação de *Bacillus* sp., *Azospirillum brasilense* e o fungo *Trichoderma asperellum*, em tratamento de sementes.

Dessa forma, o uso nas culturas agrícolas deve ocorrer de forma consciente, prezando por produtos de qualidade, na quantidade adequada. O uso das espécies, dose, concentração, modo de aplicação e cepas nas culturas devem ser cada vez mais entendida e especializada, no sistema solo – planta – microrganismo. Pois há liberação de compostos, como hormônios que podem causar desregulação no crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais. Além disso, o uso das espécies bacterianas em associação, em um processo denominado coinoculação deve ser validada e orientada pela pesquisa, pois são organismos vivos que competem pelo meio, onde precisam se estabelecer e se desenvolver, dessa forma, sua

dinâmica no solo deve ser melhor compreendida, para assim agir e promover os efeitos positivos esperados para com a cultura da soja (MAZARO et al., 2022).

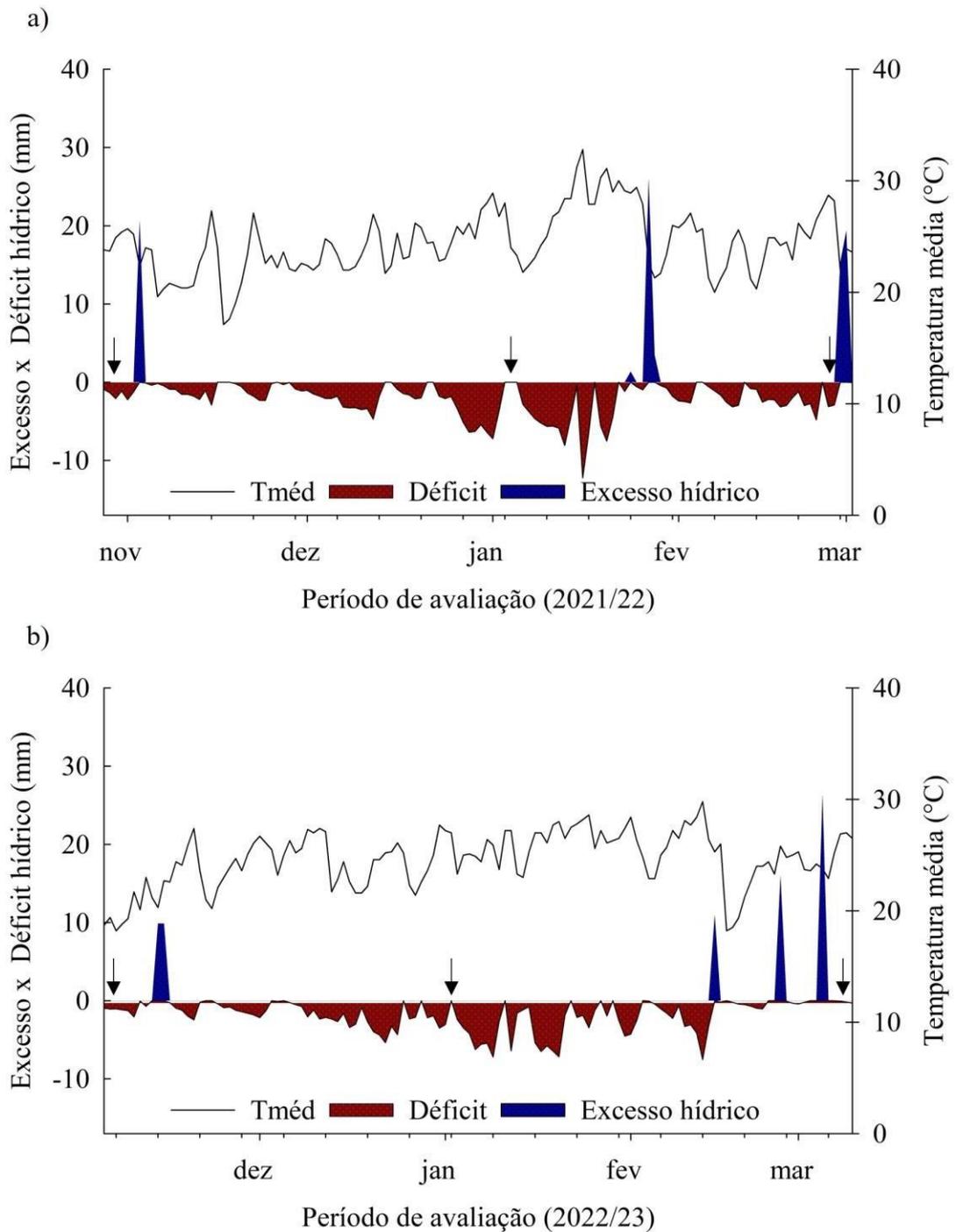
O aumento constante da população mundial, aliado as crescentes dificuldades enfrentadas pelos produtores rurais, faz com que se torne necessário a busca por alternativas eficientes, sustentáveis e econômicas de produção de alimentos (POVEDA; EUGUI, 2022). Diante disso, objetivou-se avaliar o uso conjunto de bactérias, sendo elas *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense* com diferentes doses, em coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* na promoção do crescimento da cultura da soja, em anos com efeito do La Niña.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos anos safra de 2021/22 e 2022/23 na área experimental pertencente ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), situado no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), a 29° 72' de latitude sul, 53° 73' de longitude oeste e 116 metros de altitude. Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, o solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (SANTOS, 2018). Realizou-se a amostragem de solo para a análise química para os dois anos de experimentos a campo. No ano de 2021, na profundidade de 0-10 cm os resultados foram: argila 23%; pH 5,5; CTC efetiva 10,8; MO 2,5 g; P 23,0; K 156; Ca 7,1; Mg 3,3; Al 0,0, e na profundidade de 10-20 cm: argila 29%; pH 4,6; CTC efetiva 7,7; MO 1,7 g; P 7,5; K 52; Ca 4,0; Mg 2,1; Al 1,5. No ano de 2022, na profundidade de 0-10 cm os resultados foram: argila 24%; pH 6,0; CTC efetiva 10,2; MO 2,3 g; P 20,5; K 136; Ca 6,6; Mg 3,3; Al 0,0, e na profundidade de 10-20 cm: argila 31%; pH 5,1; CTC efetiva 8,1; MO 2,1 g; P 8,4; K 80; Ca 5,0; Mg 2,6; Al 0,3.

O clima, conforme a classificação de Köppen é do tipo Cfa, subtropical sem estação seca e com verão quente (ALVARES et al., 2013). O balanço hídrico dos dois anos de experimento é apresentado na Figura 1a (safra 2021/22) e 1b (safra 2022/23), onde também é possível observar as temperaturas médias durante o ciclo da cultura.

Figura 1 - Balanço hídrico e temperaturas médias do ar na área experimental durante os dois anos de cultivo da soja (safra 2021/2022 e 2022/2023). As setas indicam respectivamente a semeadura, florescimento e colheita da cultura da soja.



Fonte: INMET (2023).

A cultivar de soja utilizada foi a DM 66I68 RSF IPRO (crescimento indeterminado, grupo de maturação 6.6 e massa de mil sementes de 194 g), sendo escolhida por possuir

características de boa adaptação às condições edafoclimáticas da região onde a pesquisa foi realizada. O espaçamento entre fileiras foi de 0,45 m com 14 plantas por metro linear, totalizando a densidade de semeadura em 311.111 plantas por ha⁻¹. No primeiro ano, os experimentos foram semeados nos dias 28 e 29 de outubro de 2021, com adubação de 350 kg ha⁻¹ na formulação 00-20-30, no segundo ano, o experimento foi semeado no dia 2 de novembro de 2022, com 320 kg ha⁻¹ de adubo na formulação 00-28-20 e os demais manejos culturais foram realizados conforme as indicações e necessidade para a cultura da soja.

3.2.1 Experimento de Campo (Safrá 2021/2022)

No primeiro ano foram realizados sete experimentos com o objetivo de avaliar espécies de bactérias promotoras de crescimento e doses em coinoculação no sulco de semeadura e aplicação foliar. Para isso, os experimentos foram dispostos no delineamento blocos ao acaso com quatro repetições. Os experimentos 2, 6 e 7 contaram com aplicação dos bioinsumos via sulco de semeadura, através de um sistema de inoculação acoplado a semeadora, para um volume de calda de 50 Lha⁻¹, com a finalidade de avaliar a compatibilidade entre os microrganismos. Cada unidade experimental teve 7,75 m de comprimento e 2,25 m de largura, composto por cinco fileiras com espaçamento de 0,45 m, totalizando uma área de 17,4 m². Nos experimentos 1, 3, 4 e 5 foi realizada a aplicação dos bioinsumos no sulco e foliar (bifatorial AxD), com a finalidade de avaliar sua ação de promoção de crescimento por meio da pulverização na folha, com volume de calda de 140 Lha⁻¹. Cada unidade experimental teve 3,87 m de comprimento e 2,25 m de largura, composto por cinco fileiras com espaçamento de 0,45 m, totalizando uma área de 8,66 m².

Os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5 contaram com um tratamento sem inoculação, tratamentos com uma espécie inoculada e tratamentos com coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (dose 2L ha⁻¹) e aumento das doses das outras bactérias. Os experimentos 6 e 7 também contaram com um tratamento sem inoculação e os demais se baseiam na combinação de diversos microrganismos e dosagens. A aplicação foliar dos microrganismos foi realizada nos experimentos que continham as bactérias *B. subtilis*, *B. aryabhattai*, *P. fluorescens* e *A. brasilense*, no estágio vegetativo V5 (FEHR; CAVINESS, 1977). Na Tabela 1, estão apresentadas as espécies bacterianas utilizadas, a concentração e a dosagens utilizadas em cada experimento.

Tabela 1. Distribuição dos experimentos do primeiro ano (campo, safra 2021/2022)

Exp.	Microrganismos combinados a Bj* SEMIA 586 (4x10 ¹⁰)	Sulco (dose L/ha)**		Foliar (dose L/ha)***
		Isolada	Coinoculação	
1	Bs ATCC 6051 (2x10 ¹⁰)	2	0,2; 0,5; 2 e 4	2
2	Bm CBMAI 2222 (2x10 ⁸)	2	0,1; 0,5; 2 e 4	-
3	Ba CBMAI 1120 (1x10 ⁹)	2	0,1; 0,5; 2 e 4	2
4	Pf ATCC 13525 (3x10 ⁹)	2	0,2; 0,5; 2 e 4	2
5	Ab ATCC 29145 (1x10 ⁹)	2	0,1; 0,5; 2 e 4	2
6	Ab + Bm + Pf + Ba	-	1; 2; 2; 2	-
7	Bm + Pf	-	2; 2; 2	-

**Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba).

**Doses para aplicação em sulco com volume de calda de 50 L/ha.

***Doses para aplicação foliar com volume de calda de 140 L/ha.

Fonte: Autor (2023).

3.2.2 Experimento de Campo (Safra 2022/2023)

O experimento do segundo ano, 2022/23, foi disposto no delineamento blocos ao acaso com quatro repetições, no qual contou com aplicação do bioinsumo via sulco de semeadura, sendo que cada unidade experimental teve 7,75 m de comprimento e 2,25 m de largura, composto por cinco fileiras com espaçamento de 0,45 m, totalizando uma área de 17,4 m². As dosagens utilizadas foram selecionadas de acordo com os tratamentos que promoveram melhores resultados dos sete experimentos da safra de 2021/22, a fim de serem testados novamente a nível de campo. A seleção teve como critério todas as variáveis avaliadas. Abaixo, na Tabela 2 está a descrição do experimento com seus respectivos tratamentos e dosagens:

Tabela 2 - Distribuição dos tratamentos do experimento 8 (campo, safra 2022/2023)

Tratamentos	Microrganismos	Sulco (dose L/ha)
T1	Sem inoculação	0**
T2	Bj* (4x10 ¹⁰)	2
T3	Bj + Bs (2x10 ¹⁰)	2 + 2
T4	Bj + Bm (2,6x10 ⁸)	2 + 0,1
T5	Bj + Ba (1,4x10 ⁹)	2 + 0,1
T6	Bj + Pf (4x10 ¹⁰)	2 + 0,2
T7	Bj + Ab (4,5x10 ⁸)	2 + 2
T8	Bj + Ab + Bm + Pf + Ba	2 + 1 + 2 + 2 + 2
T9	Bj + Pf	2 + 2
T10	Bj + Ab + Bm + Pf + Ba	2 + 0,7 + 0,5 + 0,5 + 0,5

**Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba).

**Doses para aplicação em sulco com volume de calda de 50 L/ha.

Fonte: Autor (2023).

As variáveis avaliadas nos experimentos de campo, para os dois anos, começaram a ser avaliadas no estágio fenológico V5 (plantas com 5 nós), momento em que foi avaliado o percentual de cobertura do solo (P5), com auxílio de um aparelho celular, onde capturou-se imagens na altura de 1,30 m, na fileira central de cada parcela e posteriormente as imagens foram processadas pelo aplicativo Canopeo (PATRIGNANI; OCHSNER, 2015). Em V8 (plantas com 8 nós), essa avaliação foi repetida (P8).

No estágio fenológico R2 (floração plena) foi realizada a coleta aleatória de plantas por unidade experimental, com auxílio de uma pá de corte foram abertas trincheiras de 40 cm de largura e 20 cm de profundidade, a fim de preservar ao máximo o sistema radicular da planta. No ano de 2021/22 foram coletadas três plantas, já no ano de 2022/23 foram coletadas cinco plantas por parcela (a fim de obter uma melhor representatividade experimental). As folhas foram destacadas e posicionadas lado a lado para serem fotografadas, com auxílio de um aparelho celular e, posteriormente, processadas pelo programa ImageJ (FERREIRA; RASBAND, 2011), para determinação do índice de área foliar (IAF, cm²).

As raízes das plantas coletadas foram devidamente lavadas, os nódulos foram destacados e após foi realizada a contagem, para obtenção do número de nódulos por planta (NN, planta⁻¹). Após a contagem, os nódulos foram levados para a secagem em estufa de circulação forçada de ar, permanecendo nesse local até atingir massa constante e com auxílio de uma balança de precisão de 0,001 g, foi verificada a massa seca de nódulos (MN, g planta⁻¹). As raízes lavadas foram dispostas sobre uma placa de acrílico contendo água e com auxílio

do programa WhinRhizo© Pro 2013 foram obtidas e analisada as imagens, a fim de obter as variáveis área superficial (AR, cm²), volume (VR, cm³) e comprimento de raiz (CR, cm).

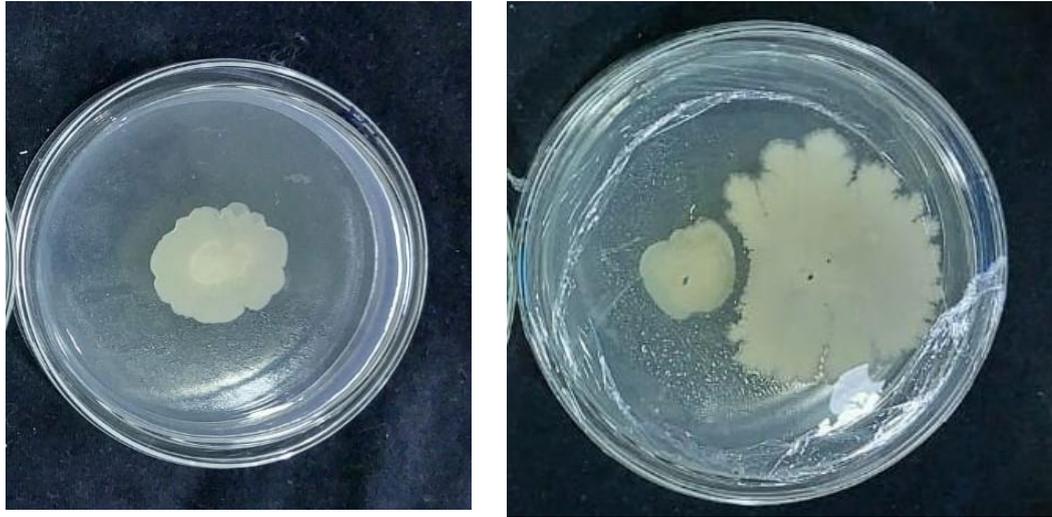
Ao final do ciclo da cultura foi realizada a colheita com auxílio de uma moto segadeira. As amostras foram trilhadas, limpas e pesadas, aferindo o teor de umidade e corrigindo para 13%, para obtenção da produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹). Além disso, foi determinado a massa de 1000 grãos (MG, g), a pesagem foi feita utilizando uma balança analítica.

Os dados foram submetidos a análise estatística de posição e dispersão, e posteriormente, feita a análise de variância (teste F). Para os efeitos significativos, as médias foram separadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando os pacotes do programa R (R CORE TEAM, 2021).

3.2.3 Experimento de Laboratório

Este experimento foi realizado no laboratório Multibac, localizado na área didático experimental pertencente ao Grupo Coxilha, na Universidade Federal de Santa Maria. Teve como finalidade observar o crescimento *in vitro* das bactérias utilizadas a campo, na forma de isolada (uma bactéria isolada na placa) e combinada (duas bactérias na placa), conforme Figura 2. O experimento foi realizado através de um bifatorial, sendo o fator A as diferentes bactérias (*A. brasilense*, *B. japonicum*, *B. aryabhatai*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. fluorescens*) e o fator D as formas de aplicação (isolado e combinado), conforme Tabela 3.

Figura 2 – Disposição das bactérias nas placas, de forma isolada (lado esquerdo) e forma combinada (lado direito)



Fonte: Autor (2023).

Tabela 3 – Contrastes entre os tratamentos testados considerando a bactéria isolada (Iso) e em combinação (Com) em placas de petri

Bactérias														
1*	2	Aplic	1	2	Aplic	1	2	Aplic	1	2	Aplic	1	2	Aplic
Bj**	-	Iso***	Ba	-	Iso	Bm	-	Iso	Bs	-	Iso	Ab	-	Iso
Bj	Ba	Com	Ba	Bm	Com	Bm	Bs	Com	Bs	Ab	Com	Ab	Pf	Com
Bj	Bm	Com	Ba	Bs	Com	Bm	Ab	Com	Bs	Pf	Com			
Bj	Bs	Com	Ba	Ab	Com	Bm	Pf	Com						
Bj	Ab	Com	Ba	Pf	Com									
Bj	Pf	Com												

*A bactéria 2 está em combinação a bactéria 1.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf) e *Bacillus aryabhattai* (Ba).

***Iso: isolado; Com: combinado

Fonte: Autor (2023).

A variável observada foi o crescimento da colônia bacteriana (cm^2) após o período de oito dias de incubação, através da captura de fotos das placas que foram processadas no programa ImageJ (FERREIRA; RASBAND, 2011). Para isto com o auxílio de uma alça de platina esterilizada foram retiradas amostras do produto biológico de cada bactéria utilizada,

sendo essa amostra depositada sobre meio de cultura ágar nutriente previamente autoclavado e vertido em placas de petri de 8 cm de diâmetro. Quando apenas uma bactéria foi depositada no centro da placa, o processo foi denominado de isolado, já no processo denominado de combinado, duas bactérias foram depositadas com 2 cm de distância entre elas. Após a finalização do processo, as placas foram vedadas com plástico filme e acondicionadas em câmara de germinação (B.O.D), com controle de temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 24 horas de luz.

Os dados foram submetidos a estatística de posição e dispersão, e posteriormente, feita a análise de variância (teste F). Para os efeitos significativos, as médias serão separadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando os pacotes do programa R (R CORE TEAM, 2021).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

Para o experimento 1, o qual foi realizada a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis* em sulco de semeadura e aplicação foliar de *Bacillus subtilis*, as variáveis P8, IAF, NN, MN e VR obtiveram interação significativa entre os fatores aplicação em sulco e foliar. A coinoculação em sulco das diferentes bactérias alteraram significativamente as variáveis P8, PG, MG, IAF, NN, MN e VR, e a aplicação foliar as variáveis MG, NN, CR e AR, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl⁻¹); massa seca de nódulos por planta (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	6,0795(0,55) ^{ns}	6(0,23) ^{ns}	3(0,11) ^{ns}	3(0,13) ^{ns}		
Sulco	6	4,4184(0,79) ^{ns}	4(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}		
Foliar	1	-	2(0,85) ^{ns}	4(0,57) ^{ns}	4(0,00) ^{**}		
Sulco*Foliar	6	-	3(0,00) ^{**}	2(0,11) ^{ns}	6(0,74) ^{ns}		
Média	-	37,01	88,71	2995,36	195,97		
CV (%)	-	7,91	2,58	8,64	5,58		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	4(0,18) ^{ns}	4(0,16) ^{ns}	2(0,92) ^{ns}	6(0,76) ^{ns}	3(0,49) ^{ns}	5(0,95) ^{ns}
Sulco	6	5(0,04) [*]	6(0,00) ^{**}	6(0,00) ^{**}	3(0,28) ^{ns}	5(0,04) [*]	2(0,16) ^{ns}
Foliar	1	2(0,35) ^{ns}	5(0,00) ^{**}	4(0,22) ^{ns}	4(0,00) ^{**}	2(0,54) ^{ns}	4(0,04) [*]
Sulco*Foliar	6	6(0,03) [*]	3(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	5(0,09) ^{ns}	6(0,01) ^{**}	3(0,06) ^{ns}
Média	-	3,21	33,13	0,23	714,10	2,35	433,35
CV (%)	-	14,45	14,41	19,02	23,7	17,41	19,78

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

A dose Bj (2L) + Bs (0,5L) favoreceu a variável de parte aérea (IAF), nodulação (NN, MN) e sistema radicular (VR), já a coinoculação de Bj (2L) + Bs (2L) foi superior para as variáveis de parte aérea (P8) e produtividade (PG, MG), considerando os dois níveis do fator aplicação. A utilização do tratamento Bj (2L) + Bs (2L) foi 11,17% e 3,53% superior a testemunha, para as variáveis produtividade de grãos (PG) e massa de mil grãos (MG). Ademais, aplicação foliar de *B. subtilis* foi inferior para as variáveis de sistema radicular (CR, AR), conforme Tabela 5 e Tabela 6.

Tabela 5 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); volume de raiz (VR, cm³)

Sulco (L)	P8		IAF			
	Foliar					
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	89,75Aa*	82,66Bc	2,94Aa		3,39Ab	
Bj** (2)	89,81Aa	90,14Aa	3,15Aa		3,57Ab	
Bs (2)	88,33Aa	90,91Aa	2,87Aa		3,02Ab	
Bj (2) + Bs (0,2)	88,89Aa	90,71Aa	3,32Aa		2,91Ab	
Bj (2) + Bs (0,5)	92,25Aa	88,85Ab	3,25Ba		4,37Aa	
Bj (2) + Bs (2)	89,75Aa	90,49Aa	3,13Aa		3,19Ab	
Bj (2) + Bs (4)	82,63Bb	86,86Ab	3,34Aa		2,49Bb	
Sulco (L)	NN		MN		VR	
	Foliar					
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	22,33Bb	31,00Ac	0,26Aa	0,22Ab	2,48Aa	2,42Ab
Bj (2)	30,16Aa	32,67Ac	0,20Ab	0,14Ac	2,57Aa	2,04Ab
Bs (2)	34,67Aa	14,67Bd	0,25Aa	0,08Bc	2,11Aa	2,01Ab
Bj (2) + Bs (0,2)	38,83Aa	37,00Ac	0,24Aa	0,30Aa	2,42Aa	2,43Ab
Bj (2) + Bs (0,5)	38,33Ba	68,50Aa	0,28Ba	0,39Aa	2,45Ba	3,31Aa
Bj (2) + Bs (2)	21,33Ab	27,00Ac	0,14Ab	0,19Ab	1,91Aa	2,29Ab
Bj (2) + Bs (4)	21,33Ab	46,00Ab	0,16Bb	0,33Aa	2,84Aa	1,72Ab

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Bacillus subtilis* (Bs).

Fonte: Autor (2023).

Tabela 6 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); comprimento de raiz (CR, cm); área superficial de raiz (AR, cm²); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e massa de mil grãos (MG, g)

Sulco (L)	P5	CR	AR	PG	MG
Testemunha	37,81*	571,78	141,63	2994,37b	192,77b
Bj** (2)	35,31	759,49	147,66	2888,68b	201,56a
Bs (2)	38,12	681,48	130,01	2975,53b	198,97a
Bj (2) + Bs (0,2)	37,76	774,03	153,30	2970,79b	189,86b
Bj (2) + Bs (0,5)	35,99	797,46	169,46	2720,87b	180,41b
Bj (2) + Bs (2)	37,39	663,78	122,95	3328,89a	199,57a
Bj (2) + Bs (4)	36,68	750,69	146,14	3088,39b	208,67a
Foliar		CR	AR	PG	MG
Sem		818,09a	153,78a	3015,25	188,36b
Com		610,11b	135,12b	2975,47	203,58a

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Bacillus subtilis* (Bs).

Fonte: Autor (2023).

4.2 EXPERIMENTO 2

No experimento 2, onde foram utilizados *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus megaterium* em coinoculação no sulco de semeadura, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para as variáveis P5, PG, MG, IAF, NN, CR e AR, as demais não obtiveram diferença significativa, conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	84,624 (0,00)**	91,336 (0,03)*	28874 (0,61) ^{ns}	164,63 (0,27) ^{ns}		
Sulco	6	22,980 (0,04)*	23,673 (0,45) ^{ns}	331812 (0,00)**	390,47 (0,02)**		
Média	-	53,91	66,58	2589,46	190,18		
CV (%)	-	5,41	7,31	7,58	5,66		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	0,1757 (0,18) ^{ns}	182,13 (0,11) ^{ns}	0,00 (0,96) ^{ns}	712 (0,95) ^{ns}	0,0486 (0,83) ^{ns}	20,84 (0,96) ^{ns}
Sulco	6	0,9255 (0,00)**	394,91 (0,00)**	0,0037 (0,18) ^{ns}	150777 (0,00)**	0,2975 (0,39) ^{ns}	2628,00 (0,02)*
Média	-	2,96	53,10	0,29	890,63	2,29	161,03
CV (%)	-	9,86	15,84	13,91	13,31	22,2	15,68

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

As doses de Bj (2L), Bm (2L) e Bj (2L) + Bm (0,5L) mostraram-se superiores para produtividade (PG, MG), porém não diferiram estatisticamente da testemunha sem inoculação de microrganismos. Já Bj (2L) + Bm (4L) foi superior para número de nódulos (NN) e comprimento e área superficial de raízes (CR, AR), com acréscimo de 88,15%, 71,76% e 26%, respectivamente, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	PG	MG	IAF
Testemunha	54,53a*	65,34	2629,20a	192,71a	3,19b
Bj** (2)	55,47a	67,05	2873,97a	198,35a	3,10b
Bm (2)	49,98b	64,87	2758,18a	206,08a	2,96b
Bj (2) + Bm (0,1)	55,98a	71,39	2670,38a	180,38b	3,96a
Bj (2) + Bm (0,5)	54,03a	66,69	2684,94a	190,77a	2,72c
Bj (2) + Bm (2)	56,12a	66,88	2416,82b	178,97b	2,32c
Bj (2) + Bm (4)	51,25b	63,83	2092,78c	184,02b	2,46c
Sulco (L)	NN	MN	CR	VR	AR
Testemunha	38,89b	0,37	771,45c	2,72	172,45b
Bj (2)	43,56b	0,31	837,73c	1,96	143,75b
Bm (2)	47,56b	0,31	647,10c	1,85	122,19b
Bj (2) + Bm (0,1)	61,00a	0,34	754,29c	2,51	154,19b
Bj (2) + Bm (0,5)	53,89b	0,27	875,14c	2,37	151,39b
Bj (2) + Bm (2)	53,67b	0,34	1023,69b	2,15	166,03b
Bj (2) + Bm (4)	73,17a	0,37	1325,04a	2,49	217,19a

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Bacillus megaterium* (Bm).

Fonte: Autor (2023).

4.3 EXPERIMENTO 3

Para o experimento 3, o qual contou com a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus aryabhatai* em sulco de semeadura e aplicação foliar da bactéria *Bacillus aryabhatai*, houve interação significativa entre os fatores sulco e foliar para as variáveis P8, MG, NN e MN. Houve diferença estatística para a aplicação em sulco nas variáveis P5, P8, PG, NN, MN, CR e AR. Para aplicação foliar as variáveis PG, NN, CR e AR tiveram diferenças significativas, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	32,224(0,15) ^{ns}	4(0,00) [*]	4(0,93) ^{ns}	4(0,02) [*]		
Sulco	6	91,185(0,00) ^{**}	3(0,00) [*]	5(0,04) [*]	3(0,26) ^{ns}		
Foliar	1	-	2(0,99) ^{ns}	6(0,03) [*]	6(0,42) ^{ns}		
Sulco*Foliar	6	-	5(0,00) [*]	2(0,53) ^{ns}	5(0,00) ^{**}		
Média	-	35,78	86,46	2756,51	199,91		
CV (%)	-	11,2	2,73	11,88	5,24		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	4(0,37) ^{ns}	6(0,15) ^{ns}	2(0,81) ^{ns}	6(0,01) ^{**}	2(0,91) ^{ns}	2(0,10) ^{ns}
Sulco	6	5(0,26) ^{ns}	5(0,00) ^{**}	6(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	6(0,13) ^{ns}	4(0,00) ^{**}
Foliar	1	2(0,79) ^{ns}	4(0,00) ^{**}	4(0,12) ^{ns}	4(0,00) ^{**}	3(0,67) ^{ns}	3(0,05) [*]
Sulco*Foliar	6	6(0,08) ^{ns}	2(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	3(0,31) ^{ns}	4(0,51) ^{ns}	5(0,73) ^{ns}
Média	-	3,14	23,27	0,18	680,72	2,25	136,99
CV (%)	-	24,64	17,34	19,33	18,87	25,76	14,89

** , * , e ^{ns} , significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

No experimento 3, para as variáveis de nodulação (NN, MN) e sistema radicular (CR, AR), a inoculação de Bj (2L) e a coinoculação de Bj (2L) + Ba (0,5L) resultaram em respostas superiores estatisticamente, porém, para comprimento (CR) e área superficial de raízes (AR) o aumento de doses não propiciou em ganhos em relação à testemunha, sem inoculação de microrganismos, quando analisado os dois níveis do fator aplicação foliar.

Para as variáveis de produtividade (PG, MG), as inoculações Bj (2L), Ba (2L) e a coinoculação de Bj (2L) + Ba (0,1L) foram superiores estatisticamente, porém não diferiram da testemunha sem inoculação microrganismos. Nesse experimento, a maior dose, não trouxe incrementos para as variáveis de nodulação (NN, MN), sistema radicular (CR, VR, AR) e produtividade de grãos (PG), conforme Tabela 10 e Tabela 11

Tabela 10 - Médias para as variáveis percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); número de nódulos (NN, pl) e massa seca de nódulos (MN, g)

Sulco (L)	P8		MG	
	Foliar			
	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	90,20Aa*	85,25Bb	197,57Aa	200,08Aa
Bj** (2)	83,65Ab	86,91Aa	215,36Aa	193,69Ba
Ba (2)	86,87Aa	83,76Ab	197,41Aa	202,60Aa
Bj (2) + Ba (0,1)	88,70Aa	89,52Aa	200,47Aa	190,16 Aa
Bj (2) + Ba (0,5)	90,84Aa	85,06Bb	197,51Aa	205,08Aa
Bj (2) + Ba (2)	80,59Bc	86,87Aa	182,69Ba	205,36Aa
Bj (2) + Ba (4)	84,36Bb	87,91Aa	200,44Aa	210,32Aa

Sulco (L)	NN		MN	
	Foliar			
	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	16,50Ab	17,67Ac	0,13Ab	0,16Ab
Bj** (2)	24,56Ba	41,17Aa	0,21Ba	0,32Aa
Ba (2)	24,50Aa	23,11Ab	0,21Aa	0,15Bb
Bj (2) + Ba (0,1)	17,83Ab	22,22Ab	0,12Ab	0,12Ac
Bj (2) + Ba (0,5)	21,44Ba	38,67Aa	0,21Ba	0,30Aa
Bj (2) + Ba (2)	25,67Aa	24,89Ab	0,21Aa	0,22Ab
Bj (2) + Ba (4)	15,89Ab	11,67Ac	0,14Ab	0,09Ac

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Bacillus aryabhatai* (Ba)

Fonte: Autor (2023).

Tabela 11 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); índice de área foliar (IAF, cm²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	PG	IAF	CR	VR	AR
Testemunha	41,76a*	2799,88a	3,24	679,71a	2,30	139,46a
Bj** (2)	29,66b	2995,55a	3,32	771,25a	2,19	143,36a
Ba (2)	35,14b	2895,85a	2,84	695,43a	2,10	134,45a
Bj (2) + Ba (0,1)	33,55b	2853,41a	2,66	615,34b	2,05	122,49b
Bj (2) + Ba (0,5)	30,85b	2522,44b	3,34	792,95a	2,43	153,97a
Bj (2) + Ba (2)	38,65a	2561,33b	3,72	733,92a	2,86	160,09a
Bj (2) + Ba (4)	40,84a	2667,12b	2,85	476,71b	1,86	105,13b

Foliar	PG	IAF	CR	VR	AR
Sem	2857,63a	3,11	605,1b	2,29	130,64 b
Com	2655,39b	3,17	756,11a	2,22	143,34 a

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Bacillus aryabhatai* (Ba).

Fonte: Autor (2023).

4.4 EXPERIMENTO 4

Esse experimento recebeu *Bradyrhizobium japonicum* e *Pseudomonas fluorescens* em coinoculação no sulco de semeadura e aplicação foliar da bactéria *Pseudomonas fluorescens*. A Tabela 12 apresenta o resumo da análise de variância, no qual houve interação significativa entre os fatores para as variáveis PG, NN e MN. Para o fator aplicação em sulco, houve diferença significativa para as variáveis IAF, NN, MN e CR, já para aplicação foliar P8, PG, MG, NN, MN e AR.

Tabela 12 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³); área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	45,471(0,32) ^{ns}	5(0,88) ^{ns}	4(0,06) ^{ns}	5(0,77) ^{ns}		
Sulco	6	77,303(0,13) ^{ns}	3(0,56) ^{ns}	3(0,06) ^{ns}	6(0,88) ^{ns}		
Foliar	1	-	2(0,01) ^{**}	2(0,00) ^{**}	3(0,00) ^{**}		
Sulco*Foliar	6	-	6(0,08) ^{ns}	5(0,02) ^{**}	4(0,14) ^{ns}		
Média	-	52,00	71,78	3136,81	212,05		
CV (%)	-	11,55	5,92	9,02	6,57		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	2(0,65) ^{ns}	5(0,76) ^{ns}	2(0,91) ^{ns}	2(0,82) ^{ns}	2(0,86) ^{ns}	2(0,53) ^{ns}
Sulco	6	6(0,00) ^{**}	3(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	5(0,00) ^{**}	4(0,29) ^{ns}	3(0,66) ^{ns}
Foliar	1	3(0,44) ^{ns}	2(0,00) ^{**}	6(0,00) ^{**}	4(0,84) ^{ns}	6(0,08) ^{ns}	6(0,00) ^{**}
Sulco*Foliar	6	5(0,29) ^{ns}	6(0,04) ^{**}	4(0,00) ^{**}	3(0,06) ^{ns}	5(0,07) ^{ns}	4(0,52) ^{ns}
Média	-	2,58	35,76	0,28	1128,05	2,25	170,06
CV (%)		13,51	14,7	14,23	24,68	16,23	13,71

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

No experimento 4, a inoculação de Pf (2L) mostrou-se superior para as variáveis de parte aérea (IAF), sistema radicular (CR), nodulação (NN, MN) e de produtividade de grãos (PG). Já a coinoculação de Bj (2L) + Pf (0,2L) mostrou-se superior também para as variáveis número de nódulos (NN) e índice de área foliar (IAF), considerando os dois níveis do fator aplicação foliar, conforme Tabela 13 e Tabela 14.

Tabela 13 - Médias para as variáveis: produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g)

Sulco (L)	PG		NN		MN	
	Foliar					
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	3485,14Aa*	2531,16Bb	45,00Aa	27,44Bb	0,36Ab	0,14Bb
Bj** (2)	3164,59Aa	3003,77Ab	36,67Aa	18,17Bb	0,30Ab	0,17Bb
Pf (2)	3343,61Aa	3342,00Aa	42,83Aa	38,67Aa	0,48Aa	0,22Ba
Bj (2) + Pf (0,2)	3450,46Aa	2869,66Ab	42,56Aa	40,83Aa	0,31Ab	0,25Aa
Bj (2) + Pf (0,5)	3150,08Aa	2894,34Ab	38,33Aa	19,67Bb	0,28Ab	0,15Bb
Bj (2) + Pf (2)	3052,01Aa	2956,01Ab	46,56Aa	39,50Aa	0,33Ab	0,24Ba
Bj (2) + Pf (4)	3454,01Aa	3218,49Aa	44,83Aa	19,67Bb	0,41Aa	0,28Ba

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Pseudomonas fluorencens* (Pf).

Fonte: Autor (2023).

Tabela 14 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³); área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	MG	IAF	CR	VR	AR
Testemunha	50,86*	73,43	211,56	2,22b	1110,77b	2,17	162,32
Bj** (2)	49,03	73,46	211,84	2,32b	987,61b	2,25	166,53
Pf (2)	51,74	70,52	214,56	2,99a	1668,99a	2,32	182,20
Bj (2) + Pf (0,2)	47,09	72,19	206,16	2,76a	1014,15b	2,21	167,69
Bj (2) + Pf (0,5)	55,30	71,29	215,96	2,51b	1035,58b	2,01	160,86
Bj (2) + Pf (2)	53,43	71,29	211,94	2,77a	1093,35b	2,25	174,19
Bj (2) + Pf (4)	56,58	70,46	212,36	2,52b	985,89b	2,56	176,64
Foliar	P8	MG	IAF	CR	VR	AR	
Sem	-	73,12a	205,79b	2,54	1136,33	2,36	182,63a
Com	-	70,26b	218,31a	2,63	1119,77	2,15	157,49b

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Pseudomonas fluorencens* (Pf).

Fonte: Autor (2023).

4.5 EXPERIMENTO 5

Nesse experimento foi realizada a aplicação em coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no sulco de semeadura e aplicação foliar da bactéria *Azospirillum brasilense*. Na Tabela 15 está disposta a análise de variância,

onde os resultados mostram que houve interação significativa entre os dois fatores para as variáveis PG, NN e MN. Para o fator aplicação em sulco, houve diferença estatística entre os tratamentos para a variável P8, IAF, NN, MN, CR e AR, já na aplicação foliar houve diferença apenas para a variável P8.

Tabela 15 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	86,325(0,00)**	2(0,00)**	3(0,08) ^{ns}	6(0,65) ^{ns}		
Sulco	6	21,991(0,10) ^{ns}	5(0,00)**	5(0,66) ^{ns}	3(0,30) ^{ns}		
Foliar	1	-	6(0,00)**	2(0,16) ^{ns}	5(0,87) ^{ns}		
Sulco*Foliar	6	-	4(0,39) ^{ns}	4(0,01)**	4(0,24) ^{ns}		
Média	-	55,34	84,86	2931,40	216,08		
CV (%)	-	5,82	6,39	10,73	5,85		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	3(0,73) ^{ns}	2(0,10) ^{ns}	2(0,74) ^{ns}	3(0,02)**	6(0,04)**	5(0,00)**
Sulco	6	6(0,04)**	3(0,00)**	6(0,00)**	4(0,00)**	5(0,12) ^{ns}	4(0,00)**
Foliar	1	5(0,18) ^{ns}	4(0,44) ^{ns}	4(0,18) ^{ns}	2(0,09) ^{ns}	2(0,58) ^{ns}	3(0,94) ^{ns}
Sulco*Foliar	6	2(0,92) ^{ns}	5(0,00)**	5(0,00)**	6(0,25) ^{ns}	4(0,19) ^{ns}	2(0,05)*
Média	-	2,84	42,44	0,30	947,60	2,45	173,95
CV (%)	-	20,73	17,06	26,31	21,08	18,33	15,27

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

No experimento 5, a coinoculação de Bj (2L) + Ab (2L) mostrou-se superior para as variáveis de parte aérea (IAF, P8), sistema radicular (CR, AR), nodulação (NN, MN) e produtividade de grãos (PG), considerando os dois níveis do fator aplicação foliar. Com a aplicação de Bj (2L) + Ab (2L), o percentual de cobertura do solo em V8, comprimento e área superficial de raízes tiveram incremento de 16,67%, 59,72% e 33,58%, respectivamente, quando comparado a testemunha sem inoculação de microrganismos, conforme Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16 - Médias para as variáveis: produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); número de nódulos (NN, pl) e massa seca de nódulos (MN, g)

Sulco (L)	PG		NN		MN	
	Foliar					
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Testemunha	3041,47Aa*	2641,99Aa	31,00Bc	46,50Ab	0,21Ac	0,31Aa
Bj** (2)	3052,57Aa	2864,79Aa	48,89Ab	39,00Ac	0,60Aa	0,38Ba
Ab (2)	2890,45Aa	2718,03Aa	37,67Ab	31,67Ac	0,34Ab	0,28Aa
Bj (2) + Ab (0,1)	2600,46Ba	3193,28Aa	44,50Ab	45,67Ab	0,34Ab	0,33Aa
Bj (2) + Ab (0,5)	3062,30Aa	3062,74Aa	20,33Bc	39,17Ac	0,15Bc	0,37Aa
Bj (2) + Ab (2)	3258,29Aa	2618,65Ba	83,67Aa	62,17Ba	0,52Aa	0,30Ba
Bj (2) + Ab (4)	3031,71Aa	3002,94Aa	37,11Ab	26,83Ac	0,27Aa	0,23Aa

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Azospirillum brasilense* (Ab).

Fonte: Autor (2023).

Tabela 17 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	MG	IAF	CR	VR	AR
Testemunha	54,92*	72,96b	216,42	2,78 a	872,51b	2,45	162,66b
Bj (2)	59,09	89,62a	208,50	3,14 a	1042,58b	2,75	188,59a
Ab (2)	54,93	87,41a	213,28	2,82 a	787,37b	2,36	166,83b
Bj (2) + Ab (0,1)	56,74	93,09a	221,12	2,02 b	925,55b	1,93	149,16b
Bj (2) + Ab (0,5)	54,55	88,18a	215,28	3,06 a	761,04b	2,46	160,45b
Bj (2) + Ab (2)	55,78	85,12a	214,44	3,07 a	1393,61a	2,52	217,29a
Bj (2) + Ab (4)	51,37	77,69b	223,50	3,02 a	850,56b	2,41	172,73b
Foliar	-	P8	MG	IAF	CR	VR	AR
Sem	-	89,00a	216,35	2,97	1001,87	2,45	174,23 a
Com	-	80,73b	215,80	2,71	893,33	2,37	173,69 b

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Azospirillum brasilense* (Ab)

Fonte: Autor (2023).

4.6 EXPERIMENTO 6

O experimento 6 contou com a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus aryabhattai* em sulco de semeadura. Houve diferença significativa entre os tratamentos somente para as variáveis P5, NN, conforme Tabela 18.

Tabela 18 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	17,33 (0,17) ^{ns}	86,62 (0,00) ^{**}	194446 (0,27) ^{ns}	1,660 (0,99) ^{ns}		
Sulco	5	155,20 (0,00) ^{**}	7,804 (0,06) ^{ns}	191468 (0,27) ^{ns}	69,596 (0,51) ^{ns}		
Média	-	66,40	83,98	3612,17	202,10		
CV (%)	-	4,53	1,97	10,2	4,38		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	0,7156 (0,20) ^{ns}	345,72 (0,03) [*]	0,0006 (0,82) ^{ns}	69693 (0,08) ^{ns}	0,1575 (0,66) ^{ns}	709,56 (0,30) ^{ns}
Sulco	5	0,2884 (0,60) ^{ns}	440,80 (0,00) ^{**}	0,0027 (0,49) ^{ns}	27142 (0,35) ^{ns}	0,1240 (0,87) ^{ns}	510,59 (0,48) ^{ns}
Média	-	2,85	37,22	0,24	649,64	2,07	124,23
CV (%)	-	21,65	22,57	22,13	22,6	29,09	18,43

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

Neste experimento, a dose de Bj (2L) + Ab (1L) mostrou-se superior para as variáveis de parte aérea (P5) e nodulação (NN). O número de nódulos foi superior também com a aplicação de Bj (2L) + Ab (1L) + Bm (2L) + Pf (2L), não diferindo estatisticamente da testemunha, sem aplicação de microrganismos em sulco de semeadura. O percentual de cobertura do solo em V5 teve incremento de 25,63% quando comparada a testemunha. As demais variáveis não tiveram diferenças significativas entre os tratamentos, conforme Tabela 19.

Tabela 19 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estágio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estágio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³); área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	PG	MG	IAF
Testemunha	57,83c*	83,52	3688,37	198,14	2,62
Bj** (2)	68,68b	83,90	3928,98	205,64	2,95
Bj (2) + Ab (1)	72,65a	85,77	3507,44	206,28	2,74
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2)	72,81a	85,51	3745,19	203,39	2,83
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2)	60,48c	83,00	3490,28	203,26	3,41
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2) + Ba (2)	65,96b	82,23	3312,78	195,91	2,55
Sulco (L)	NN	MN	CR	VR	AR
Testemunha	50,00a	0,26	602,77	2,14	118,65
Bj (2)	29,22b	0,22	599,07	1,84	116,56
Bj (2) + Ab (1)	45,67a	0,26	550,64	2,21	104,41
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2)	25,56b	0,20	669,44	2,17	134,09
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2)	48,67a	0,27	652,87	2,29	135,17
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2) + Ba (2)	24,22b	0,25	823,65	1,80	136,53

* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autor (2023).

4.7 EXPERIMENTO 7

O experimento 7 contou com a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* em sulco de semeadura. Houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis P5, PG e MG, conforme apresentado na Tabela 20.

Tabela 20 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	73,14 (0,00)**	79,396 (0,00)**	135218 (0,30) ^{ns}	369,22 (0,01)**		
Sulco	6	41,770 (0,00)**	22,156 (0,05)*	319960 (0,02)**	421,12 (0,00)**		
Média	-	50,73	90,44	2853,97	211,68		
CV(%)	-	5,38	3,3	10,17	4,2		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	0,0348 (0,84) ^{ns}	105,91 (0,66) ^{ns}	0,019 (0,17) ^{ns}	7872 (0,81) ^{ns}	0,0608 (0,63) ^{ns}	56,61 (0,93) ^{ns}
Sulco	6	0,9816 (0,00)**	335,68 (0,32) ^{ns}	0,014 (0,26) ^{ns}	19834 (0,80) ^{ns}	0,0603 (0,86) ^{ns}	374,07 (0,82) ^{ns}
Média	-	3,35	50,40	0,33	1136,25	2,31	182,64
CV(%)	-	13,66	31,8	30,1	17,14	15,98	15,03

** , * , e ^{ns}, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

As doses Bj (2L), Bm (2L), Bj (2L) + Bm (2L) e Bm (2L) + Pf (2L) foram superiores para as variáveis de produtividade (PG e MG), porém não diferiram estatisticamente da testemunha, sem aplicação de microrganismos. O percentual de cobertura do solo em V5, foi superior com a aplicação de Bj (2L), Bj (2L) + Pf (2L) e Bj (2L) + Bm (2L) + Pf (2L), sem diferir da testemunha, conforme Tabela 21.

Tabela 21 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	PG	MG	IAF
Testemunha	54,35a*	91,19	3162,40a	223,64a	3,01b
Bj** (2)	53,01a	89,93	3033,13a	208,66a	3,15b
Bm (2)	45,57b	87,00	2942,45a	221,09a	3,59b
Pf (2)	48,42b	89,08	2874,98a	204,64b	4,17a
Bj (2) + Bm (2)	49,52b	90,87	2866,39a	215,10a	3,36b
Bj (2) + Pf (2)	53,62a	93,29	2836,04a	191,37c	3,96a
Bm (2) + Pf (2)	48,12b	88,31	2825,21a	212,67a	3,24b
Bj (2) + Bm (2) + Pf (2)	53,22a	93,82	2291,18b	216,29a	2,34b
Sulco (L)	NN	MN	CR	VR	AR
Testemunha	45,22	0,32	1078,28	2,39	191,59
Bj (2)	57,11	0,35	1141,83	2,32	182,08
Bm (2)	50,11	0,34	1167,93	2,33	184,22
Pf (2)	37,67	0,22	1022,10	2,31	171,98
Bj (2) + Bm (2)	50,78	0,30	1199,27	2,24	181,98
Bj (2) + Pf (2)	72,00	0,46	1249,08	2,53	198,47
Bm (2) + Pf (2)	41,44	0,37	1190,99	2,37	188,07
Bj (2) + Bm (2) + Pf (2)	48,89	0,28	1040,57	2,03	162,75

* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

** *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Bacillus megaterium* (Bm) e *Pseudomonas fluorescens* (Pf).

Fonte: Autor (2023).

4.8 EXPERIMENTO 8

O experimento 8 foi realizado no segundo ano, safra 2022-23, onde foram selecionadas as doses Bj (2L) + Bs (2L), Bj (2L) + Bm (0,1L), Bj (2L) + Ba (0,1L), Bj (2L) + Pf (0,2L), Bj (2L) + Ab (2L), os quais resultaram em respostas significativas levando em conta o peso de cada variável e sua importância para o objetivo final que é o aumento de produtividade. Além dessas dosagens foram acrescentados três tratamentos, sendo eles Bj (2L) + Ab (1L) + Bm (2L) + Pf (2L) + Ba (2L), Bj (2L) + Pf (2L) e Bj (2L) + Ab (0,7L) + Bm (0,5L) + Pf (0,5L) + Ba (5L). A análise de variância apresentada na Tabela 22 nos mostra que houve diferença significativa para as variáveis P5, P8, PG e MG.

Tabela 22 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidade (P) para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹); massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

FV	GL	P5	P8	PG	MG		
Bloco	3	120,042 (0,01)**	262,562 (0,00)**	225595 (0,01)**	414,47 (0,00)**		
Sulco	9	179,610 (0,00)**	80,280 (0,00)**	282577 (0,00)**	239,23 (0,00)**		
Média	-	43,88	78,76	3451,9	221,24		
CV (%)	-	11,69	5,51	6,75	3,18		
		IAF	NN	MN	CR	VR	AR
Bloco	2	3,0220 (0,02)**	255,27 (0,21) ^{ns}	0,0076 (0,34) ^{ns}	42730 (0,17) ^{ns}	2,3715 (0,34) ^{ns}	4287,9 (0,24) ^{ns}
Sulco	9	1,6356 (0,06) ^{ns}	127,26 (0,61) ^{ns}	0,0056 (0,57) ^{ns}	47734 (0,08) ^{ns}	1,1926 (0,79) ^{ns}	3362,8 (0,36) ^{ns}
Média	-	5,46	50,53	0,29	765,42	5,64	234,59
CV (%)	-	16,03	24,96	27,47	20,33	25,34	22,98

** , * , e ^{ns} , significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autor (2023).

Para esse experimento, os tratamentos que receberam a inoculação de Bj (2L) e a coinoculação de dois microrganismos Bj (2L) + Bs (2L), Bj (2L) + Ba (0,1L) obtiveram resultados superiores para as variáveis de parte aérea (P5, P8) e de produtividade (PG, MG), obtendo em média incremento de 25,53%, 14,65%, 7,88% e 4,85%, respectivamente. Os tratamentos no qual foram utilizados cinco microrganismos em mistura, obtiveram resultados superiores para parte aérea (P5, P8) e produtividade de grãos (PG), conforme Tabela 23.

Tabela 23 - Médias para as variáveis: percentual de cobertura do solo no estádio V5 (P5, %); percentual de cobertura do solo no estádio V8 (P8, %); produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), massa de mil grãos (MG, g); índice de área foliar (IAF, cm²); número de nódulos (NN, pl); massa seca de nódulos (MN, g); comprimento de raiz (CR, cm); volume de raiz (VR, cm³) e área superficial de raiz (AR, cm²)

Sulco (L)	P5	P8	PG	MG	IAF
Testemunha	40,39 b*	72,70 b	3366,47 b	220,52 b	4,87
Bj** (2)	48,34 a	81,54 a	3516,49 a	226,98 a	6,63
Bj (2) + Bs (2)	52,36 a	84,15 a	3726,02 a	233,57 a	5,21
Bj (2) + Bm (0,1)	36,85 b	76,71 b	3257,08 b	214,05 b	5,46
Bj (2) + Ba (0,1)	51,42 a	84,37 a	3653,51 a	233,10 a	6,57
Bj (2) + Pf (0,2)	32,43 b	76,47 b	3251,65 b	211,10 b	5,33
Bj (2) + Ab (2)	45,83 a	75,88 b	2948,78 b	217,22 b	4,83
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2) + Ba (2)	48,43 a	81,64 a	3812,65 a	222,01 b	5,49
Bj (2) + Pf (2)	37,79 b	72,39 b	3345,18 b	215,54 b	5,21
Bj (2) + Ab (0,7) + Bm (0,5) + Pf (0,5) + Ba (0,5)	45,04 a	81,78 a	3641,17 a	218,31 b	5,04
Sulco (L)	NN	MN	CR	VR	AR
Testemunha	43,53	0,28	597,62	4,92	179,73
Bj (2)	56,25	0,29	973,21	6,22	274,58
Bj (2) + Bs (2)	53,65	0,34	770,14	6,19	241,62
Bj (2) + Bm (0,1)	54,20	0,22	777,83	5,68	264,15
Bj (2) + Ba (0,1)	55,60	0,35	694,47	5,85	222,22
Bj (2) + Pf (0,2)	51,13	0,29	691,17	5,25	213,20
Bj (2) + Ab (2)	43,45	0,28	892,88	5,90	255,35
Bj (2) + Ab (1) + Bm (2) + Pf (2) + Ba (2)	50,85	0,29	826,24	6,36	255,31
Bj (2) + Pf (2)	55,20	0,31	729,11	4,98	227,98
Bj (2) + Ab (0,7) + Bm (0,5) + Pf (0,5) + Ba (0,5)	41,40	0,25	701,53	5,08	211,77

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

***Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba).

Fonte: Autor (2023).

Com os dois anos de experimentos conduzidos a campo, foi possível perceber que nas condições testadas, a coinoculação de Bj 2L + Bs 2L e Bj 2L + Ba 0,1L foram os tratamentos que se destacaram nas variáveis avaliadas para ambos os anos.

4.9 EXPERIMENTO 9

No experimento 9, houve interação significativa entre os dois fatores para a combinação de *B. japonicum* e *A. brasilense* (Bj x Ab), *B. megaterium* e *B. subtilis* (Bm x Bs), *B. megaterium* e *A. brasilense* (Bm x Ab), *B. subtilis* e *A. brasilense* (Bs x Ab), *B. subtilis* e *P. fluorescens* (Bs x Pf). Não houve diferença estatística para o fator bactéria, somente na combinação entre *B. subtilis* e *A. brasilense* (Bs x Ab). Já para o fator aplicação houve diferença estatística para *B. japonicum* e *B. subtilis* (Bj x Bs), *B. japonicum* e *A. brasilense* (Bj x Ab), *B. megaterium* e *A. brasilense* (Bm x Ab), *B. subtilis* e *P. fluorescens* (Bs x Pf),

conforme análise de variância apresentada na Tabela 24.

Tabela 24 - Resumo da análise de variância com os quadrados médios e as probabilidades (P) para crescimento da colônia bacteriana (cm²) das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba).

FV	GL	Bj Ba	Bj Bm	Bj Bs	Bj Ab	Bj Pf
Bac***	1	5(0,02)*	4(0,00)**	3(0,00)**	3(0,00)**	5(0,00)**
Apli	1	2(0,81) ^{ns}	4(0,64) ^{ns}	4(0,00)**	2(0,05)*	2(0,39) ^{ns}
Bac*Apli	1	4(0,44) ^{ns}	3(0,63) ^{ns}	5(0,06) ^{ns}	5(0,01)**	2(0,36) ^{ns}
Média	-	14,77	1,36	6,98	7,27	6,18
CV (%)	-	22,28	34,88	16,91	19,84	25,45
FV	GL	Ba Bm	Ba Bs	Ba Ab	Ba Pf	Bm Bs
Bactéria	1	5(0,00)**	4(0,00)**	5(0,00)**	5(0,00)**	4(0,00)**
Aplicação	1	4(0,31) ^{ns}	3(0,15) ^{ns}	2(0,93) ^{ns}	3(0,93) ^{ns}	3(0,24) ^{ns}
Bac*Apli	1	2(0,47) ^{ns}	2(0,69) ^{ns}	4(0,65) ^{ns}	2(0,06) ^{ns}	5(0,03)*
Média	-	8,44	9,69	10,31	7,26	2,71
CV (%)	-	28,14	27,53	31,52	27,98	37,17
FV	GL	Bm Ab	Bm Pf	Bs Ab	Bs Pf	Ab Pf
Bactéria	1	2(0,00)**	5(0,00)**	5(0,99) ^{ns}	5(0,00)**	5(0,00)**
Aplicação	1	4(0,00)**	2(0,68) ^{ns}	4(0,19) ^{ns}	3(0,00)**	2(0,94) ^{ns}
Bac*Aplic	1	5(0,00)**	3(0,65) ^{ns}	5(0,04)*	4(0,00)**	4(0,99) ^{ns}
Média	-	4,52	0,74	3,74	2,09	1,79
CV (%)	-	47,14	15,81	25,7	17,74	69,72

** , * , e ns, significativo a 1, 5% e não significativo respectivamente, pelo teste F; FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação

*** Bac: bactéria; Apli: aplicação

Fonte: Autor (2023).

Na Tabela 25 estão apresentadas as médias para as combinações em que houve interação significativa entre os fatores, ou seja, onde o crescimento de uma bactéria interferiu negativamente ou positivamente no crescimento da outra. Na combinação de Bj x Ab, *B. japonicum* teve redução significativa em seu crescimento de 34,95%, mas o *A. brasilense* teve aumento de 21%. A combinação de Bm x Bs resultou em 57% de aumento para *B. megaterium* e redução significativa de 47% para a bactéria *B. subtilis*. Já entre Bm x Ab, *B. megaterium* teve redução de 43% e *A. brasilense* teve aumento significativo de 262% em seu crescimento de colônia. Quando Bs x Ab foram combinadas houve redução significativa de 44% para *B. subtilis* e aumento de 16% para *A. brasilense*. E por fim, a combinação entre Bs x Pf resultou em redução significativa de 34% do crescimento de colônia para *B. subtilis*, enquanto houve aumento 6% para *P. fluorescens*. Sendo todos os valores percentuais apresentados comparados ao crescimento isolado das bactérias.

Tabela 25 - Tabela de médias da interação entre os fatores bactéria e aplicação, para a variável crescimento da colônia bacteriana (cm²), das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba)

Bactéria	Aplicação											
	Iso*		Com		Iso		Com		Iso		Com	
	Bj ¹ Ab ²		Bm ¹ Bs ²		Bm ¹ Ab ²		Bs ¹ Ab ²		Bs ¹ Pf ²			
1	12,99Aa**	8,45 Ba	1,34 Ab	2,11 Aa	1,34 Aa	0,76 Ab	4,81 Aa	2,67 Ba	4,81 Aa	3,18 Ba		
2	3,46 Ab	4,17 Ab	4,81 Aa	2,57 Ba	3,46 Ba	12,52 Aa	3,46 Aa	4,02 Aa	0,18 Ab	0,19 Ab		

*Iso: isolado; Com: combinado

**médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autor (2023).

Para as associações que não resultaram em interação, foram analisados os efeitos principais. Dessa forma é possível observar que essas bactérias não interferiram no crescimento da outra, mas possuem velocidade de crescimento distintas.

Foi observado que *B. japonicum* teve crescimento superior com médias de 12,34 cm², 10,32 cm² e 12,15 cm² em comparação às bactérias *B. megaterium*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*, as quais tiveram médias de 1,36 cm², 3,64 cm² e 0,21 cm² respectivamente. *B. aryabhattai* foi superior significativamente com médias de 17,55 cm², 15,76 cm², 16,11 cm², 17,53 cm² e 14,36 cm² em comparação às bactérias *B. japonicum*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *A. brasilense* e *P. fluorescens*, as quais resultaram em médias de 11,99 cm², 1,12 cm², 3,27 cm², 3,10 cm² e 0,16 cm², respectivamente. Já *B. megaterium* e *A. brasilense* foram superiores, com médias de 1,31 cm² e 3,43 cm², quando comparadas à *P. fluorescens*, bactéria que apresentou média de 0,18 cm² e 0,15 cm², respectivamente. Para o fator aplicação, somente houve diferença significativa na combinação entre Bj x Bs, no qual a bactéria isolada resultou em média superior 8,9 cm² em comparação a combinação com crescimento de 5,06 cm². Porém, no geral, as maiores médias foram alcançadas quando as bactérias cresceram de forma isolada, conforme Tabela 26.

Tabela 26 - Tabela de médias para os efeitos principais da variável crescimento da colônia bacteriana (cm²), para as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus megaterium* (Bm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus aryabhattai* (Ba)

Bactéria	Bj¹ Ba²	Bj¹ Bm²	Bj¹ Bs²	Bj¹ Pf²	Ba¹ Bm²
1**	11,99 b*	12,34 a	10,32 a	12,15 a	15,76 a
2	17,55 a	1,36 b	3,64 b	0,21 b	1,12 b
Aplicação	Bj Ba	Bj Bm	Bj Bs	Bj Pf	Ba Bm
Isolado	15,00	7,17	8,90 a	6,58	9,18
Combinado	14,54	6,50	5,06 b	5,78	7,70
Bactéria	Ba¹ Bs²	Ba¹ Ab²	Ba¹ Pf²	Bm¹ Pf²	Ab¹ Pf²
1	16,11 a	17,53 a	14,36 a	1,31 a	3,43 a
2	3,27 b	3,10 b	0,16 b	0,18 b	0,15 b
Aplicação	Ba Bs	Ba Ab	Ba Pf	Bm Pf	Ab Pf
Isolado	10,91	10,24	8,59	0,73	1,82
Combinado	8,47	10,39	5,94	0,76	1,77

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

**Bactéria 1 e 2 referem-se à primeira e segunda bactéria apresentadas na tabela, respectivamente.

Fonte: Autor (2023).

5 DISCUSSÃO

A cada ano, fatores ambientais adversos impactam cada vez mais na agricultura em todo o mundo. Embora o déficit hídrico seja o fator abiótico que mais interfere no estado hídrico das plantas, a gravidade do seu efeito é dependente da temperatura predominante (JUMRANI; BHATIA, 2018). Nos anos em que os experimentos foram conduzidos, houve influência do fenômeno La Niña, o qual na região sul do Brasil caracteriza-se pela redução da precipitação. Houve déficit hídrico em momentos decisivos do ciclo da cultura (Figura 1a e 1b), principalmente na fase reprodutiva, o que interfere direta e indiretamente no estabelecimento, crescimento, nodulação das plantas e produtividade final de grãos (HUNGRIA; VARGAS, 2000; IQBAL et al., 2022; JUMRANI; BHATIA, 2018; JUMRANI; BHATIA; PANDEY, 2017; KASPER et al., 2019). Apesar dos experimentos terem enfrentado períodos com déficit hídrico no decorrer do ciclo, sua produtividade média foi alta. A média dos tratamentos que receberam microrganismos resultou em 3203,93 kg ha⁻¹ para o ano de 2021/2022 e 3461,40 kg ha⁻¹ no ano de 2022/23, comparado a média do estado do Rio Grande do Sul que foi de 1.433 kg ha⁻¹ e 1.986 kg ha⁻¹, respectivamente (CONAB, 2023). Porém, a falta de água afeta a sobrevivência dos microrganismos inoculados pois, condições adequadas de temperatura e umidade do solo, são essenciais a sobrevivência das bactérias, acarretando em prejuízos na sua eficiência (BARBOSA et al., 2021; CERZINI et al., 2016). Pinto et al.

(2023) observaram que a exposição a solo seco e temperaturas acima de 32°C, em um período de 2 horas, resultou em queda na sobrevivência das bactérias, 3×10^4 UFC.semente⁻¹, a níveis inferiores ao mínimo necessário a uma boa inoculação, passando de $1,2 \times 10^6$ UFC.semente⁻¹ (HUNGRIA et al., 2017), mesmo com a aplicação inicial de alta concentração da bactéria (5×10^9 UFC mL⁻¹). Quanto maior o tempo de exposição maior os danos à sobrevivência dos microrganismos, o que pode ser ainda agravado com o cultivo convencional, o solo exposto aumenta sua variação de temperatura devido à falta de cobertura vegetal (BARBOSA et al., 2021).

A aplicação foliar de bactérias nas culturas agrícolas é um método comum de pulverização sobre as folhas desenvolvidas, com o objetivo de proteção contra doenças, quando sua ação se restringe a folha e promoção de crescimento vegetal, quando os microrganismos alcançam o solo. O microrganismo é aplicado sobre a planta em um momento ideal para que seja absorvido via estômatos (célula foliar), diminuindo o risco de incompatibilidade com o tratamento químico de sementes (FUKAMI et al., 2016; KORDATZAKI et al., 2022). A pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* resultou em maior quantidade de perfilhos na cultura do trigo e aumento de 773 kg ha⁻¹ na produtividade do milho (FUKAMI et al., 2016). Porém, para Zuffo et al. (2016) as doses de 0, 300, 400, 500 600 e 700 mL ha⁻¹ de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 (1×10^8 UFC mL⁻¹) não afetaram a produtividade da cultura as soja. *B. subtilis* aumentou a taxa fotossintética da couve e quando inserida no manejo fitossanitário promoveu a proteção contra patógenos, além de reduzir a desfolha e manter a produtividade da soja (KORDATZAKI et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

A exposição da filosfera à radiação ultravioleta, vento, chuva e variação brusca de temperatura no decorrer do dia afetam a permanência dos microrganismos na folha, reduzindo sua concentração e diversidade. Logo, aplicações foliares demandam altas dosagens e concentração de produto para ser absorvido por ela, permanecendo na epiderme ou apoplasto foliar, local com passagem de água e nutrientes (FUKAMI et al., 2016; SANTOYO, 2022). Nesse estudo houve a aplicação no estágio vegetativo V5 (quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida - FEHR; CAVINESS, 1977), apesar de haver incremento em algumas variáveis, não houve resposta constante para recomendar sua aplicação. Devido a isso, são necessários mais estudos com aplicações sequenciais via foliar das bactérias *A. brasilense*, *B. subtilis*, *B. aryabhattai* e *P. fluorescens*.

A capacidade fotossintética de uma planta está diretamente ligada a área foliar que ela possui para interceptação da radiação solar e do carbono atmosférico, transformando-os em

fotoassimilados para seu metabolismo, o que será translocado para os órgãos em formação e finalmente para os grãos (SOBA; ARRESE-IGOR; ARANJUELO, 2022). Neste trabalho, os tratamentos Bj 2L + Bs 0,5L (exp.1), Bj 2L + Ab 1L (exp.6) e Bj 2L, Bj 2L + Bs 2L, Bj 2L + Ba 0,1L (exp.8) foram superiores para percentual de cobertura no estágio V5. Os tratamentos Bj 2L + Bs 2L (exp.1), Bj 2L + Ab 2L (exp.5) e Bj 2L, Bj 2L + Bs 2L, Bj 2L + Ba 0,1L (exp.8) foram superiores para percentual de cobertura no estágio vegetativo V8. Já para o índice de área foliar, os tratamentos Bj 2L + Bs 0,5L (exp.1), Pf 2L e Bj 2L + Pf 0,2L (exp.4) e Bj 2L + Ab 2L (exp.5) foram superiores. Tais bactérias e doses promoveram o desenvolvimento da parte aérea das plantas, pois a utilização de BPCV favorece a cobertura do solo devido a produção e liberação de hormônios que promovem o crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas (SWARNALAKSHMI et al., 2020). ZEFFA et al. (2020) em sua metátese mostrou que a coinoculação trouxe um aumento na biomassa de parte aérea em 6,43%. *Pseudomonas fluorescens* são capazes de liberar ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucônico (GA) no solo o que acarreta solubilização dos complexos de fosfato, disponibilizando o nutriente às plantas. As cepas L111, L228, L321 apresentaram alta capacidade de solubilização de fosfato e a cepa L321 promoveu o crescimento vegetal para a ervilha (OTIENO et al., 2015).

Plantas com um sistema radicular bem desenvolvido possuem a capacidade de explorar mais profundamente as camadas de solo, garantindo sua sustentação e aquisição de nutrientes e água (BARBOSA et al., 2021). O tratamento Bj 2L + Bs 0,5L (exp.1) foi o responsável por garantir maior volume radicular para as plantas. Melhores resultados para comprimento radicular foram alcançados com Bj 2L + Bm 4L (exp.2), Bj 2L e Bj 2L + Ba 0,5L (exp.3), Pf 2L (exp.4), Bj 2L + Ab 2L (exp.5). Já para a variável área superficial de raízes, os tratamentos Bj 2L + Bm 4L (exp.2), Bj 2L e Bj 2L + Ba 0,5L (exp.3), Bj 2L + Ab 2L (exp.5) obtiveram os resultados superiores para o desenvolvimento radicular. A capacidade das bactérias em alterar a arquitetura radicular vem da síntese e secreção de hormônios responsáveis pelo crescimento vegetal (FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). A coinoculação com BPCV trouxe aumento de 12,84% em biomassa radicular (ZEFFA et al., 2020). *A. brasilense* cepa Az39 realiza a síntese de vários hormônios dentre eles a auxina do tipo ácido indol-3-acético (IAA), responsável pela formação de raízes laterais, pelos radiculares, aumentando a superfície e volume de absorção das raízes (PUENTE et al., 2018). A capacidade de estimular os parâmetros das raízes também induzem a respostas para a tolerância ao estresse hídrico, em coinoculação na semente com *B. japonicum*, o *A. brasilense* cepas AbV₅ e AbV₆ amenizaram os efeitos do estresse hídrico para

as culturas do feijão e soja (SILVA et al., 2019). Assim como o gênero *Pseudomonas* estimula o crescimento de parte aérea pela liberação de ácidos capazes de solubilizar elementos adsorvidos do solo, como o ferro e o fósforo, também induz o desenvolvimento de sistema radicular das plantas (PATHMA; KENNEDY; SAKTHIVEL, 2011). O fitohormônio citocinina produzido por *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* promove a divisão, aumento e expansão do tecido celular, sendo responsável por aumentar a área de superfície radicular por meio da formação de raízes adventícias e laterais. Além disso, possui papel importante na infecção por rizóbios e na diferenciação de nódulos em leguminosas (FRUGIER et al., 2008; SWARNALAKSHMI et al., 2020).

A nodulação das raízes de soja é resultado da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, a qual tem por função realizar a fixação biológica de nitrogênio. No presente trabalho os tratamentos com coinoculação foram superiores, como Bj 2L + Bs 0,5L (exp.1), Bj 2L + Bm 4L (exp.2), Bj 2L e Bj 2L + Ba 0,5L (exp.3), Pf 2L e Bj 2L + Pf 0,2 L (exp.4), Bj 2L + Ab 2L (exp.5), Bj 2L + Ab 1L (exp.6), os quais obtiveram resultados superiores para número de nódulos. HUNGRIA; CAMPO; MENDES (2007) afirmam que o número ideal para boa FBN é de 15 a 30 nódulos por planta. Nesse estudo todos os tratamentos resultaram em valores superiores a esses, inclusive para a testemunha sem aplicação. Tais resultados podem ser explicados devido a área ser inoculada todos os anos, e dessa forma já possuir população estabelecida (FERREIRA, 2022; FULANETI, 2022). Hungria; Mendes (2015) apontam que em aéreas com histórico de inoculação, a população de *Bradyrhizobium* spp. pode alcançar concentrações de 10^6 g solo⁻¹. Dessa forma a inoculação anual se torna benéfica pois caso ocorram problemas na inoculação, e houver redução do número de células bacterianas nas sementes, devido a fatores de temperatura, umidade ou incompatibilidade com tratamento de sementes químico, haverá, mesmo que tardiamente nodulação por rizóbios de solo (PINTO et al., 2023).

Apesar do número de nódulos ser uma característica importante para a fixação de nitrogênio, sua massa deve ser avaliada. Nódulos maiores possuem maior tecido capaz de fixar N e dessa forma, conseguem transformar em N disponível a planta em maior quantidade do que nódulos pequenos (MARTINS et al., 2022; SIBPONKRUNG et al., 2020). Os tratamentos Bj 2L + Bs 0,5L (exp.1), Bj 2L e Bj 2L + Ba 0,5L (exp.3), Pf 2L e Bj 2L + Pf 0,2 L (exp.4), Bj 2L + Ab 2L (exp.5) foram superiores para massa seca de nódulos. Bactérias como *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense* são incapazes de fixar nitrogênio, mas possibilitam o aumento da nodulação (SCHMIDT; MESSMER; WILBOIS, 2015). A metánalise de Barbosa et al, (2021), indica que a coinoculação de *A. brasilense* e

Bradyrhizobium spp. aumenta em 5,4 % e 10,6% o número e a massa de nódulos, em relação à inoculação apenas com *Bradyrhizobium* spp. Silva et al. (2019) perceberam que em situação de estresse hídrico severo o maior potencial de nodulação foi obtido com a coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*, já em situação controle o *B. japonicum* foi melhor. *P. fluorescens* tem a capacidade de solubilizar fosfatos, sendo esse nutriente necessário para a iniciação, crescimento e funcionamento dos nódulos, além do crescimento do vegetal (ISRAEL, 1987; SWARNALAKSHMI et al., 2020). Diante disso, os hormônios produzidos pelas bactérias promovem o aumento do número de pelos radiculares, levando a formação de mais sítios de interação rizóbios - soja e capacidade de formação de nódulos (SAIKIA et al., 2010; SCHMIDT; MESSMER; WILBOIS, 2015; ZEFFA et al., 2020).

A produtividade é a variável mais importante quando o assunto é a cultura da soja, pois ela é representa o retorno econômico para o produtor. Os tratamentos Bj 2L + Bs 2L (exp.1), Pf 2L (exp.4), Bj 2L + Ab 2L (exp.5), Bj 2L, Bj 2L + Bs 2L, Bj 2L + Ba 0,1L (exp.8), obtiveram resultados superiores para a produtividade final de grãos. Para a massa de mil grãos, os tratamentos Bj 2L + Bs 2L (exp.1), Bj 2L, Bj 2L + Bs 2L, Bj 2L + Ba 0,1L (exp.8), apresentaram maiores médias. A maior capacidade de exploração do solo, fruto do crescimento radicular ou o maior desenvolvimento da área foliar são características que induzem a captura de nutrientes e água para maior produção de grãos. O aumento ou manutenção da produtividade de grãos seguem aumentos significativos na nodulação e crescimento radicular (BARBOSA et al., 2021). Em contrapartida Zeffa et al. (2020) aponta que a coinoculação trouxe incremento nas variáveis de raiz, nodulação e parte aérea mas não incrementou em produtividade final. No presente estudo, diferentes doses de coinoculação de *B. japonicum* com *B. subtilis*, *B. aryabhattai*, *B. megaterium* e *A. brasilense* foram superiores. A coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* promoveu aumento na produtividade de grãos, sob restrição hídrica moderada (CEREZINI et al., 2016). Coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* melhorou a produtividade de grãos de soja, quando comparado a inoculação apenas com *Bradyrhizobium*, em experimentos de campo realizados diferentes regiões brasileiras (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

Experimentos com foco em dose de produtos biológicos para as culturas agrícolas ainda são limitados. A alta dosagem de bioinsumo pode desregular o desenvolvimento da cultura, pois bactérias liberam diversos compostos para sua defesa, alimentação e permanência no meio em que estão inseridas. O tratamento Bj 2L + Bs 4L (exp.1) resultou em resposta inferior para número de nódulos e produtividade, Bj 2L + Bm 4L (exp.2) foi inferior para produtividade, massa de mil grãos e índice de área foliar e o tratamento Bj 2L + Ba 4L

(exp.3) foi inferior para as variáveis número e massa seca de nódulos, produtividade, comprimento e área superficial de raízes. A coinoculação de Bj 2L + Pf 4L (exp.4) foi inferior para índice de área foliar e comprimento radicular, Bj 2L + Ab 4L (exp.5) inferior para número de nódulos, comprimento e área superficial de raízes. O tratamento Bj 2L + Ab 1L + Bm 2L + Pf 2L + Ba 2L (exp.6) foi inferior para percentual de cobertura em V5 e número de nódulos. E por fim, o tratamento Bj 2L + Bm 2L + Pf 2L (exp.7) foi inferior para produtividade de grãos. Resultados do presente trabalho indicam que as doses máximas aplicadas não trouxeram efeitos positivos, quando comparado a doses inferiores, podendo ter ocorrido devido à liberação de hormônios em altas quantidades ou outros compostos. Os fitohormônios afetam os processos morfológicos e fisiológicos dos vegetais em baixas concentrações (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1997; SWARNALAKSHMI et al., 2020). É necessário considerar a alta produção de fitohormônios pelas bactérias, para evitar ultrapassar o limiar entre estimulação e inibição do crescimento das plantas (FUKAMI et al., 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Em trabalhos de campo, a inoculação de *Pseudomonas thivervalensis*, produtora de IAA, induziu o crescimento vegetal quando utilizado em baixa concentração (10^5 UFC mL⁻¹), já em maior concentração ($> 10^6$ UFC mL⁻¹) foi inibitória para *Arabidopsis thaliana* (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2001; SWARNALAKSHMI et al., 2020). A produção de citocininas pelos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* favorecem a expansão celular e desenvolvimento de raízes laterais, porém em alta concentração reduzem a formação de nódulos na cultura da soja (MENS et al., 2018). Tal prática deve ser executada com cautela, pois são espécies diferentes que demandam substratos e espaço para crescer antes de estabelecer e para enfim beneficiar à cultura (GARCIA; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021).

A coinoculação traz inúmeros benefícios para a agricultura, com aumentos produtivos e redução do uso de produtos químicos (ZEFFA et al., 2020). Porém, quando dois ou mais microrganismos são usados em consórcio irão liberar compostos que nem sempre serão positivos um para o outro, podendo resultar em incompatibilidade. O experimento 9 realizado em laboratório, apresentou resultados sobre a interação entre as bactérias analisadas nos dois anos de experimentos no campo. A coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense*, *B. megaterium* e *B. subtilis*, *B. megaterium* e *A. brasilense*, *B. subtilis* e *A. brasilense*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*, apresentaram interferência em seu crescimento, e apesar de potencializar o crescimento de uma, houve a redução do crescimento da outra. O crescimento do *Azospirillum* foi impulsionado quando esteve em combinação com *B. japonicum*, *B. megaterium* e *B. subtilis*, sua característica de ação está voltada a promoção de crescimento de plantas, através

da liberação de fitohormônios, dessa forma, seu maior crescimento em comparação as demais bactérias, pode estar relacionado com a velocidade de crescimento no meio em que está inserido. A literatura aponta diversos mecanismos de ação em que o *B. megaterium* pode atuar, principalmente a liberação de antibióticos para combater microrganismos patogênicos (ACURIO VÁSCONEZ et al., 2020), o que pode ter causado também a redução no crescimento do *B. subtilis*. A *P. fluorescens* apesar de ter apresentado a menor média de crescimento, nos oito dias de incubação, apresentou aumento em coinoculação com *B. subtilis*, podendo ser devido a sua alta capacidade de competição com a produção de ampla gama de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana. Já as demais coinoculações não resultaram em interação entre eles, mas sim diferenças na velocidade de crescimento, sendo as maiores médias das bactérias *B. japonicum* e *B. aryabhatai*. Dessa forma, o sucesso da coinoculação depende do uso adequado de espécies e cepas compatíveis, sendo importante a adequação de doses e concentração de produto.

O atual desafio para a agricultura é a implementação de estratégias e sistemas agrícolas mais sustentáveis e que sejam economicamente viáveis, acomodando tecnologias avançadas para o aumento da produtividade das culturas (AERON et al., 2020). A tecnologia da coinoculação de bactérias vem trazendo efeitos positivos inegáveis para a agricultura, com avanços de pesquisas e manutenção ou aumento da produtividade com substituição de produtos químicos. Associando as bactérias simbióticas com as promotoras de crescimento, inseridas diretamente em contato com a semente, no momento da semeadura, otimizando o crescimento da planta. Como resultados do trabalho de dois anos, as coinoculações de *B. japonicum* (2L) com *B. subtilis* (2L) e *B. japonicum* (2L) com *B. aryabhatai* (0,1L) foram as que possibilitaram melhor desenvolvimento vegetal para a cultura da soja e maior produtividade de grãos, sendo confirmado que seu crescimento *in vitro* não interfere no crescimento da outra. A maior dose das bactérias promotoras de crescimento (4L) juntamente com a bactéria simbiótica *Bradyrhizobium* (2L) e o uso de diversas espécies em uma mesma calda, não trouxeram incrementos para as variáveis avaliadas, afirmando a importância do desenvolvimento de estudos a fim de adequar espécies, cepas e doses em diferentes culturas. Além disso, por possuírem alta seletividade a resposta pode variar de acordo com o método de aplicação, genótipo da planta, condições ambientais e concentrações usadas no bioinsumo. Dessa forma, se fazem necessários mais estudos com o foco na compatibilidade entre os microrganismos e na dose do bioinsumos nas culturas, principalmente com experimentos em vasos, onde a interferência de fatores externos e dos microrganismos nativos do solo é reduzida.

6 CONCLUSÃO

A aplicação foliar das bactérias *A. brasilense*, *B. subtilis*, *B. aryabhatai*, *P. fluorescens* no estágio vegetativo V5, não promove o incremento das variáveis de crescimento e desenvolvimento da cultura da soja.

O uso de altas dosagens e mistura de espécies de microrganismos não trazem incrementos nas variáveis avaliadas na cultura da soja.

As coinoculações de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 586 (2L) + *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (2L) e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 586 (2L) + *Bacillus aryabhatai* CBMAI 1120 (0,1L) possibilitam o crescimento e desenvolvimento da cultura da soja, mesmo em anos de déficit hídrico, resultado do efeito do La Niña.

REFERENCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847–850, 1 nov. 2016.
- ACURIO VÁSCONEZ, R. D. et al. Evaluation of *Bacillus megaterium* strain AB4 as a potential biocontrol agent of *Alternaria japonica*, a mycopathogen of *Brassica oleracea* var. *italica*. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00454, 1 jun. 2020.
- AERON, A. et al. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 4, p. 665–676, 1 maio 2020.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p.1–20, 1 jan. 2014.
- ALENGEBAWY, A. et al. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. **Toxics**, v. 9, n. 3, p. 42, mar. 2021.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen’s climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, p. 711–728, 1 dez. 2013.
- ARAUJO, F. F. et al. *Bacillus subtilis* changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100348, 1 jun. 2021.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant Growth-Regulating Substances in the Rhizosphere: Microbial Production and Functions. Em: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy**. [s.l.] Academic Press, 1997. v. 62p. 45–151.
- BARBOSA, J. Z. et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 1 jul. 2021.
- BERLANGA-CLAVERO, M. V. et al. More than words: the chemistry behind the interactions in the plant holobiont. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 11, p. 4532–4544, 2020.
- BETTIOL, W. Pesquisa, desenvolvimento e inovação com bioinsumos. Em: **Tecnologias de produção de soja**. [s.l.: s.n.].
- BOCATTI, C. R. et al. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 267–280, 1 mar. 2022.
- CASSÁN, F. et al. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461–479, 1 maio 2020.
- CEREZINI, P. et al. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160–167, 1 set. 2016.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Bacillus subtilis como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja | *Diversitas Journal*. 3 fev. 2022.

CONAB. **Conab - 9º Levantamento- Safra 2022/23. Boletim da Safra de Grãos.**

Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

DALOLIO, R. S. et al. (PDF) **CO-INOCULAÇÃO DE SOJA COM Bradyrhizobium e Azospirillum.** Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/327097118_CO-INOCULACAO_DE_SOJA_COM_Bradyrhizobium_e_Azospirillum>. Acesso em: 22 nov. 2022.

DEAK, E. A. et al. Inoculation and coinoculation combined with sulfur treatment boost the physiological quality of seeds and reduce oxidative stress in soybean seedlings. *Symbiosis*, v. 87, n. 3, p. 223–235, 1 jul. 2022.

DUPUY, L. X.; SILK, W. K. Mechanisms of Early Microbial Establishment on Growing Root Surfaces. *Vadose Zone Journal*, v. 15, n. 2, p. vzj2015.06.0094, 1 fev. 2016.

ESPER NETO, M. et al. Nutrient Removal by Grain in Modern Soybean Varieties. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, 2021.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Biocontrol of plant diseases by Bacillus spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 126, p. 102048, 1 jul. 2023.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of Soybean Development. p. 11, 18 maio 1977.

FERREIRA, M. M. **Inoculação de soja com bactérias diazotróficas após períodos de manejo das culturas de inverno.** Tese—[s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 4 mar. 2022.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **The ImageJ User Guide.** , 2011. Disponível em: <<file:///E:/Downloads/ij-user-guide.pdf>>

FERRI, G. C. et al. Effects of associated co-inoculation of Bradyrhizobium japonicum with Azospirillum brasilense on soybean yield and growth. *African Journal of Agricultural Research*, v. 12, n. 1, p. 6–11, 5 jan. 2017.

FLORENCIO, C. et al. AVANÇOS NA PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE INOCULANTES MICROBIANOS VISANDO UMA AGRICULTURA MAIS SUSTENTÁVEL. *Química Nova*, v. 45, p. 1133–1145, 19 dez. 2022.

FREITAS, V. F. DE et al. Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. *Applied Soil Ecology*, v. 172, p. 104352, 1 abr. 2022.

FRUGIER, F. et al. Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science*, v. 13, n. 3, p. 115–120, 1 mar. 2008.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with Azospirillum brasilense. *AMB Express*, v. 6, n. 1, p. 3, 13 jan. 2016.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond

biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 4 maio 2018.

FUKASE, E.; MARTIN, W. Economic growth, convergence, and world food demand and supply. **World Development**, v. 132, p. 104954, 1 ago. 2020.

FULANETI, F. S. Opções de bactérias na coinoculação na cultura da soja. 4 fev. 2022.

GARCIA, M. V. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing Bradyrhizobium and Azospirillum for the soybean crop. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 71, 22 maio 2021.

GARRIDO-SANZ, D. et al. Genomic and Genetic Diversity within the Pseudomonas fluorescens Complex. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0150183, 25 fev. 2016.

GOSWAMI, D.; THAKKLER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. **Full article: Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review**. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2015.1127500>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

GOUDA, S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 1 jan. 2018.

GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; KLEIN, D. K. Promoção de crescimento e solubilização de fosfato na cultura da soja: coinoculação de sementes com Bradyrhizobium japonicum e Pseudomonas fluorescens. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e366101120078–e366101120078, 3 set. 2021.

HELIN, J.; WEIKARD, H.-P. A model for estimating phosphorus requirements of world food production. **Agricultural Systems**, v. 176, p. 102666, 1 nov. 2019.

HUNGRIA, M. et al. Inoculum Rate Effects on the Soybean Symbiosis in New or Old Fields under Tropical Conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1106–1112, 2017.

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: [s.n.].

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? Em: **Biological Nitrogen Fixation**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1009–1024.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologias de produção de soja**. [s.l.: s.n.].

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801, 1 out. 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 6, p. 811–817, 31 mar. 2015.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 151–164, 1 mar. 2000.
- IQBAL, N. et al. Clade-dependent effects of drought on nitrogen fixation and its components – Number, size, and activity of nodules in legumes. **Field Crops Research**, v. 284, p. 108586, 1 ago. 2022.
- ISRAEL, D. W. Investigation of the Role of Phosphorus in Symbiotic Dinitrogen Fixation 1. **Plant Physiology**, v. 84, n. 3, p. 835–840, 1 jul. 1987.
- JUMRANI, K.; BHATIA, V. S. Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 1, p. 37–50, 1 jan. 2018.
- JUMRANI, K.; BHATIA, V. S.; PANDEY, G. P. Impact of elevated temperatures on specific leaf weight, stomatal density, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in soybean. **Photosynthesis Research**, v. 131, n. 3, p. 333–350, 1 mar. 2017.
- KASPER, S. et al. Abiotic and Biotic Limitations to Nodulation by Leguminous Cover Crops in South Texas. **Agriculture**, v. 9, n. 10, p. 209, out. 2019.
- KAVAMURA, V. N. et al. **Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought - ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501312001413?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- KORDATZAKI, G. et al. Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on kale production and quality characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 301, p. 111094, 27 jul. 2022.
- KUZYAKOV, Y.; RAZAVI, B. S. Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 135, p. 343–360, 1 ago. 2019.
- MAPA. **Conceitos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>>. Acesso em: 9 ago. 2023.
- MARTIN, T. N. et al. Microrganismos Promotores de Crescimento, Fixadores de Nitrogênio e Solubilizadores na Cultura da Soja. Em: **Tecnologias aplicadas para o manejo rentável e eficiente da cultura da soja**. Santa Maria: Portal Embrapa, 2022.
- MARTINS, J. T. et al. Biological N fixation activity in soybean can be estimated based on nodule dry weight and is increased by additional inoculation. **Rhizosphere**, v. 24, p. 100589, 1 dez. 2022.
- MASON, A. R. G. et al. Microbial solutions to soil carbon sequestration. **Journal of Cleaner Production**, v. 417, p. 137993, 10 set. 2023.
- MAVRODI, O. V. et al. **Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Pseudomonas fluorescens Strains in the Plant Rhizosphere by Real-Time PCR | Applied and Environmental Microbiology**. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00925-07>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

MAZARO, S. M. et al. Desafios na adoção de bioinsumos. Em: **Bioinsumos na cultura da soja**. Londrina, PR: [s.n.]. p. 550.

MENS, C. et al. Local and Systemic Effect of Cytokinins on Soybean Nodulation and Regulation of Their Isopentenyl Transferase (IPT) Biosynthesis Genes Following Rhizobia Inoculation. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

MORETTI, L. G. et al. Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p.1923–1934, 1 dez. 2020.

NOGUEIRA, M. A. et al. Ações de transferência de tecnologia em inoculação/ coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná. p. 16, 2018.

OLANREWaju, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 2017.

OTIENO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

PARK, Y.-G. et al. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173203, 10 mar. 2017.

PATHMA, J.; KENNEDY, R. K.; SAKTHIVEL, N. Mechanisms of Fluorescent *Pseudomonads* That Mediate Biological Control of Phytopathogens and Plant Growth Promotion of Crop Plants. Em: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiological Plant Growth Responses**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 77–105.

PATRIGNANI, A.; OCHSNER, T. E. Canopeo: A Powerful New Tool for Measuring Fractional Green Canopy Cover. **Agronomy Journal**, v. 107, n. 6, p. 2312–2320, 2015.

PEREIRA, C. N.; CASTRO, C. N. DE. TD 2765 - Expansão da produção agrícola, novas tecnologias de produção, aumento de produtividade e o desnível tecnológico no meio rural. **Texto para Discussão**, p. 1–72, 6 maio 2022.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5, p. 325–336, 1 maio 2014.

PERSELLO-CARTIEAUX, F. et al. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. **Planta**, v. 212, n. 2, p. 190–198, 1 jan. 2001.

PINTO, D. B. B. et al. Recovery of *Bradyrhizobium* cells and effects on the physiological quality of soybean seeds sown in dry soil. **Journal of Seed Science**, v. 45, p. e202345001, 27 jan. 2023.

POVEDA, J.; EUGUI, D. Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in

sustainable agriculture. **Biological Control**, v. 176, p. 105100, 1 dez. 2022.

PUENTE, M. L. et al. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v. 76, n. 1, p. 41–49, 1 set. 2018.

RAMESH, A. et al. Plant Growth-Promoting Traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* MDSR9 Isolated from Soybean Rhizosphere and its Impact on Growth and Nutrition of Soybean and Wheat Upon Inoculation. **Agricultural Research**, v. 3, n. 1, p. 53–66, 1 mar. 2014.

REN, S. et al. **Soybean Salt Tolerance 1 (GmST1) Reduces ROS Production, Enhances ABA Sensitivity, and Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana***. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00445/full>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

REZENDE, C. C. et al. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 27 fev. 2021.

RODRIGUES, T. F. et al. Impact of pesticides in properties of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiotic performance with soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 172, 17 out. 2020.

SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, p. 195–212, jun. 2018.

SAIKIA, S. P. et al. Role of *Azospirillum* in the Improvement of Legumes. Em: KHAN, M. S.; MUSARRAT, J.; ZAIDI, A. (Eds.). **Microbes for Legume Improvement**. Vienna: Springer, 2010. p. 389–408.

SANTOS, H. G. DOS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5ª edição revista e ampliada ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

SANTOS, F. M. et al. Integrating a *Bacillus*-based product with fungicides by foliar application to protect soybean: a sustainable approach to avoid exclusive use of chemicals. **Pest Management Science**, v. 78, n. 11, p. 4832–4840, 2022.

SANTOS, M. S. et al. The Challenge of Combining High Yields with Environmentally Friendly Bioproducts: A Review on the Compatibility of Pesticides with Microbial Inoculants. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 870, maio 2021.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 205, 21 dez. 2019.

SANTOYO, G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **Journal of Advanced Research**, v. 40, p. 45–58, 1 set. 2022.

SARTORI, F. F. et al. Potentially harmful effects of seed treatment and pre-inoculation on soybean biological nitrogen fixation and yield. **European Journal of Agronomy**, v. 142, p. 126660, 1 jan. 2023.

SCHMIDT, J.; MESSMER, M.; WILBOIS, K.-P. Beneficial microorganisms for soybean (*Glycine max* (L.) Merr), with a focus on low root-zone temperatures. **Plant and Soil**, v. 397, n. 1, p. 411–445, 1 dez. 2015.

SCUDELETTI, D. et al. Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. **European Journal of Agronomy**, v. 144, p. 126749, 1 mar. 2023.

SHARMA, P.; KUMAR, S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125589, 1 nov. 2021.

SIBPONKRUNG, S. et al. Co-Inoculation of *Bacillus velezensis* Strain S141 and *Bradyrhizobium* Strains Promotes Nodule Growth and Nitrogen Fixation. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 678, maio 2020.

SILVA, E. R. et al. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 325–335, 1 abr. 2019.

SOBA, D.; ARRESE-IGOR, C.; ARANJUELO, I. Additive effects of heatwave and water stresses on soybean seed yield is caused by impaired carbon assimilation at pod formation but not at flowering. **Plant Science**, v. 321, p. 111320, 1 ago. 2022.

STEFANOSKI, D. C. et al. Uso e manejo do solo e seus impactos sobre a qualidade física. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1301–1309, dez. 2013.

SUMBUL, A. et al. *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3634–3640, 1 dez. 2020.

SUSILOWATI, A.; PUSPITA, A. A.; YUNUS, A. **Drought resistant of bacteria producing exopolysaccharide and IAA in rhizosphere of soybean plant (*Glycine max*) in Wonogiri Regency Central Java Indonesia - IOPscience**. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/142/1/012058>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

SWARNALAKSHMI, K. et al. Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1596, nov. 2020.

WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2537, 7 fev. 2018.

WU, X. et al. *GmNLP7a* inhibits soybean nodulation by interacting with *GmNIN1a*. **The Crop Journal**, 11 maio 2023.

YANG, L.-N.; REN, M.; ZHAN, J. Modeling plant diseases under climate change: evolutionary perspectives. **Trends in Plant Science**, Special issue: Food security. v. 28, n. 5, p. 519–526, 1 maio 2023.

ZEFFA, D. M. et al. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. **PeerJ**, v. 8,

p. e7905, 9 jan. 2020.

ZHAO, J. et al. Evaluation of *Bacillus aryabhattai* Sneb517 for control of *Heterodera glycines* in soybean. **Biological Control**, v. 142, p. 104147, 1 mar. 2020.

ZUFFO, A. M. et al. Soybean cultivars agronomic performance and yield according to doses of “*Azospirillum brasilense*” applied to leaves. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 4, p. 579–583, abr. 2016.