

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

Rafaela Leopoldina Silva Nunes

**INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS VIA
SEMENTE E SULCO DE SEMEADURA NA SOJA EM TERRAS
BAIXAS**

Santa Maria, RS

2023

Rafaela Leopoldina Silva Nunes

**INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS VIA SEMENTE E
SULCO DE SEMEADURA NA SOJA EM TERRAS BAIXAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Enio Marchesan

Santa Maria, RS
2023

Nunes, Rafaela Leopoldina Silva
INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS VIA
SEMENTE E SULCO DE SEMEADURA NA SOJA EM TERRAS BAIXAS /
Rafaela Leopoldina Silva Nunes.- 2023.
98 p.; 30 cm

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

1. bactérias multifuncionais 2. bioinsumos 3. fixação
biológica de nitrogênio 4. formas de aplicação 5. Glycine
max L I. Marchesan, Enio II. Newton Martin, Thomas III.
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, RAFAELA LEOPOLDINA SILVA NUNES, 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.

Rafaela Leopoldina Silva Nunes

**INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS VIA SEMENTE E
SULCO DE SEMEADURA NA SOJA EM TERRAS BAIXAS**

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

Aprovada em 03 de agosto de 2023:

Prof. Dr. Enio Marchesan (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Benjamin Dias Osorio Filho (UERGS)
(Examinador)

Prof. Dr. Glauber Monçon Fipke (UNIPAMPA)
(Examinador)

Santa Maria, RS
2023

Dedico este trabalho aos meus pais Vital Pereira e Rosilda Nunes, os quais sempre foram meus incentivadores nos estudos e apoiadores das minhas jornadas a longas distâncias, se não fossem seus esforços e amor, certamente não estaria aqui. As minhas irmãs Daniela e Elizete, ao meu namorado Alisson e sua família, por me apoiarem nas minhas decisões, por todo carinho, compreensão e incentivo. Aos amigos que fiz no Rio Grande do Sul e a todos do grupo GPAI, que me acolheram e fizeram parte dos momentos de alegria e apoio.

DEDICO E AGRADEÇO

“Vocês são o esteio que sustentam a minha vida”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre estar guiando e iluminando meu caminho, me dando forças para não desanimar e seguir em frente sempre.

A meus pais Vital Pereira e Rosilda Nunes por todo o amor, suporte, conselhos e dedicação na minha criação. Sou e serei grata a vocês por toda a vida.

As minhas irmãs Daniela e Elizete, pelo apoio, motivação, conselhos e paciência.

Ao meu namorado Alisson Wendt por estar ao meu lado, me incentivando com alegria, pelo amor, parceria e compreensão ao longo desses meses.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Enio Marchesan, pelo exemplo de profissional, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela confiança, pelos ensinamentos, orientações, contribuições, atenção, paciência, disponibilidade, críticas e amizade ao longo do tempo de convivência.

A todos os colegas e amigos do Grupo de Pesquisa em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Áreas de Várzea (GPAI) que foram fundamentais para a realização desse trabalho e permanência aqui no Rio Grande do Sul, obrigada pela amizade, paciência, acolhida, pelas orientações e por todo auxílio ao longo e depois dos experimentos, por ajudar a viabilizar todos os trabalhos e avaliações, pelas sugestões, disponibilidade e atenção.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional através do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço aos meus amigos que estão espalhados por esse Brasil, pelo apoio, conselhos e motivações. E a todos aqueles que me ajudaram e contribuíram de alguma forma, diretamente ou indiretamente para a realização desse projeto e acolhida no Rio Grande do Sul. Sem a contribuição de todos vocês, nada disso seria possível!

Muito Obrigada.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Eclesiastes 3:1

RESUMO

INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS VIA SEMENTE E SULCO DE SEMEADURA NA SOJA EM TERRAS BAIXAS

AUTORA: Rafaela Leopoldina Silva Nunes

ORIENTADOR: Enio Marchesan

A soja cultivada em áreas de terras baixas está em constante expansão, sendo rotacionada nos solos arroseiros do Rio Grande do Sul, principalmente devido à valorização econômica e os benefícios gerados ao arroz. No entanto, em terras baixas a soja pode ser afetada por diversos estresses, logo é imprescindível a adoção de ferramentas integradas de ordem física, química e biológica para a solução de problemas agrícolas. A utilização de bioinsumos pode ajudar na fixação biológica de nitrogênio, promoção do metabolismo da planta, diminuir incidências de doenças, dentre outras. Porém, a forma como irá ser disponibilizado poderá influenciar na eficiência do mesmo. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com microrganismos multifuncionais na cultura da soja, e a melhor forma de aplicação destes via tratamento de sementes e sulco de semeadura em ambiente de terras baixas. No primeiro capítulo, foi realizado um experimento em casa de vegetação, na área didático experimental de Várzea da UFSM, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez tratamentos: 1) Testemunha (sem inoculação); 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Bj); 3) Bj + *A. brasilense*; 4) Bj + *T. asperelloides*; 5) Bj + *P. fluorescens*; 6) Bj + *B. subtilis*; 7) Bj + *B. pumilus*; 8) Bj + *B. amyloliquefaciens*; 9) Bj + *B. megaterium*; 10) Bj + Bio bokashi. Aos 50 dias após a instalação, foram realizadas avaliações biométricas, fisiológicas e químicas nas plantas. Os resultados identificaram que a inoculação e coinoculação de microrganismos não interfere na parte aérea e nos teores de NPK do tecido foliar das plantas, mas, influencia positivamente o sistema radicular. A inoculação de *B. japonicum* apresenta incrementos médio de 60,8% na massa seca das raízes (MSR), 60,7% no número de nódulos (NN) e 66,6% no volume radicular (VR), apresentando também, maior taxa líquida de assimilação de carbono e eficiência do uso da água. As coinoculação com as demais bactérias estimula um maior aporte de massa seca de raiz nas plantas, com destaque para o *A. brasilense* a qual incrementou MSR, NN e VR quando comparada a inoculação simples, sendo está uma boa escolha para coinoculação. No segundo capítulo, foram realizados dois experimentos a campo, um no município de Santa Maria-RS e outro em Candelária-RS, utilizando o delineamento experimental de blocos ao acaso em parcela subdividida, bifatorial 2 x 8, com quatro repetições. Nas parcelas principais foram distribuídas duas formas de aplicação: (semente e sulco de semeadura) e nas subparcelas oito associações entre microrganismos: 1) Testemunha; 2) Bj; 3) Bj + *A. brasilense*; 4) Bj + *T. asperelloides*; 5) Bj + *P. fluorescens*; 6) Bj + *B. subtilis*; 7) Bj + *B. amyloliquefaciens*; 8) Bj + *B. megaterium*. Realizou-se mensurações de variáveis biométricas, fisiológicas, químicas nas plantas e de produtividade de grãos. Com os principais resultados obtidos, observa-se que a inoculação com *B. japonicum* é eficiente e a coinoculação com bactérias em especial com o *A. brasilense*, apresenta efeitos positivos no sistema radicular das plantas, na taxa de cobertura do dossel vegetativo e na produtividade de grãos de soja, principalmente quando aplicada no sulco de semeadura.

Palavras-chave: bactérias multifuncionais, bioinsumos, fixação biológica de nitrogênio, formas de aplicação, *Glycine max* L.

ABSTRACT

INOCULATION AND COINOCULATION OF MICROORGANISMS VIA SEED AND SOWING FURROW IN SOYBEAN IN LOWLANDS

AUTHORA: Rafaela Leopoldina Silva Nunes

ADVISOR: Enio Marchesan

Soy cultivated in lowland areas is constantly expanding, being rotated in the rice soils of Rio Grande do Sul, mainly due to the economic appreciation and benefits generated by rice. However, in lowlands soybeans can be affected by various stresses, so it is essential to adopt integrated physical, chemical and biological tools to solve agricultural problems. The use of bioinputs can help with biological nitrogen fixation, promoting plant metabolism, reducing incidences of diseases, among others. However, the way in which it will be made available may influence its efficiency. With this, the objective was to evaluate the effects of inoculation and coinoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with multifunctional microorganisms in soybean crops, and the best way to apply them via seed treatment and sowing furrow in lowland environments. In the first chapter, an experiment was carried out in a greenhouse, in the Várzea experimental teaching area at UFSM, using a completely randomized experimental design, with four replications and ten treatments: 1) Control; 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Bj); 3) Bj + *A. brasilense*; 4) Bj + *T. asperelloides*; 5) Bj + *P. fluorescens*; 6) Bj + *B. subtilis*; 7) Bj + *B. pumilus*; 8) Bj + *B. amyloliquefaciens*; 9) Bj + *B. megaterium*; 10) Bj + Bio bokashi. At 50 days after installation, biometric, physiological and chemical evaluations were carried out on the plants. The results identified that the inoculation and co-inoculation of microorganisms does not affect the aerial part and the NPK levels of the plant leaf tissue, but positively influences the root system. Inoculation of *B. japonicum* presents an average increase of 60.8% in root dry mass (MSR), 60.7% in the number of nodules (NN) and 66.6% in root volume (VR), also presenting greater net carbon assimilation rate and water use efficiency. Coinoculation with other bacteria stimulates a greater supply of dry root mass in plants, with emphasis on *A. brasilense*, which increased MSR, NN and VR when compared to simple inoculation, making it a good choice for coinoculation. In the second chapter, two field experiments were carried out, one in the municipality of Santa Maria-RS and the other in Candelária-RS, using a randomized block experimental design in a split plot, bifactorial 2 x 8, with four replications. Two forms of application were distributed in the main plots: (seed and sowing furrow) and in the subplots eight associations between microorganisms: 2) Bj; 3) Bj + *A. brasilense*; 4) Bj + *T. asperelloides*; 5) Bj + *P. fluorescens*; 6) Bj + *B. subtilis*; 7) Bj + *B. amyloliquefaciens*; 8) Bj + *B. megaterium*. Measurements of biometric, physiological and chemical variables in plants and grain productivity were carried out. With the main results obtained, it is observed that inoculation with *B. japonicum* is efficient and co-inoculation with bacteria, especially *A. brasilense*, has positive effects on the root system of plants, on the coverage rate of the vegetative canopy and on productivity. of soybeans, especially when applied in the sowing furrow.

Keywords: multifunctional bacteria, bioinputs, biological nitrogen fixation, forms of application, *Glycine max* L.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Vários fatores que modulam o recrutamento de um microbioma e as interações com a planta. Abreviaturas: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMs); Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs); Resistência Sistêmica Adquirida (SAR); Resistência Sistêmica Induzida (ISR); N,N-dimetil-1-hexadecilamina (DMHDA); ácido fenazina-1-carboxílico (PCA); Dissulfeto de dimetilo (DMDS); 2,4-diacetil floroglucinol (DAPG); Cianeto de hidrogênio (HCN).....35
- Figura 2. Microrganismos de uso opcional, obrigatório e não indicado na pulverização em sulco de semeadura.....39
- Figura 3. Microrganismos de uso opcional na pulverização aérea no estágio vegetativo da soja.....40
- Figura 4. Estrutura proposta para a aplicação bem sucedida de inoculantes microbianos na agricultura. Uma estrutura na qual os agricultores/indústria agrícola, a comunidade científica e as empresas de pesquisa e tecnologia agrícola contribuem coletivamente para alcançar o objetivo de aplicações bem-sucedidas de inoculantes microbianos. Os inoculantes microbianos devem ser personalizados para a cultura alvo, clima e propriedades do solo (painel esquerdo). Um aumento na investigação científica de microbiomas vegetais, coleções de culturas e caracterização funcional de potenciais inoculantes microbianos abre caminho para satisfazer as necessidades dos agricultores (painel direito). A integração dos inoculantes microbianos disponíveis com as necessidades dos agricultores e a produção e formulação em larga escala é realizada por empresas de tecnologia agrícola (painel central).....41

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Temperatura média diária (°C) para o período de desenvolvimento da soja cultivada em condições de casa de vegetação.....62
- Figura 2. Desenvolvimento das plantas do experimento em estágio R1 na casa de vegetação (A), avaliação fisiológica utilizando o medidor portátil Infra Red Gas Analyzer IRGA (B) e lavagem das raízes e nódulos para posterior avaliação (C).....63

CAPÍTULO 2

Figura 1. Croqui da área experimental e o detalhe da parcela.....	78
Figura 2. Semeadura do experimento: A - Demonstração das 4 primeiras linhas da semeadora em amarelo com a inoculação sendo realizada nas sementes onde os jatos do sulco foram desligados e em azul as 4 linhas da semeadora que tiveram a inoculação feita por meio do jato dirigido no sulco. B - Momento de limpeza do tanque para adição de outro tratamento.....	79
Figura 3. Precipitação total mensal (mm) e temperatura média mensal (°C) para o período de desenvolvimento da soja cultivada em Santa Maria e Candelária.....	80
Figura 4. Avaliações: A - Coleta das plantas a campo, B - Aferições em laboratório e C - Utilização do IRGA.....	81
Figura 5. Desdobramento da interação formas de aplicação versus microrganismos na produtividade de grãos (kg ha ⁻¹) avaliada no experimento de Santa Maria, RS. Safra 2021/22.....	92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados na inoculação e coinoculação no experimento.....61
- Tabela 2. Estatura da planta, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN), volume radicular (VR) em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.....65
- Tabela 3. Taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (Gs), concentração intracelular de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) em folhas de soja aos 44 dias após a emergência (DAE) em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.....67
- Tabela 4. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja no estágio fenológico R1, em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.....69

CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Análise físico-química dos solos experimentais realizados em Santa Maria (RS) e Candelária (RS) na safra de 2021/22.....77
- Tabela 2. População inicial de plantas (PIP), estatura da planta, massa seca da parte aérea (MSPA) e taxa de cobertura do dossel vegetativo (TCD), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.....83
- Tabela 3. Desdobramento da interação formas de aplicação versus microrganismos para a taxa de cobertura do dossel vegetativo - TCD (%), avaliada nos experimentos de Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.....85
- Tabela 4. Comprimento radicular (CR), massa seca do sistema radicular (MSR), massa seca de nódulos (MSN), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.....85
- Tabela 5. Taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (Gs),

concentração intracelular de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) em folhas de soja aos 40 e 78 dias após a emergência (DAE), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria, RS. Safra 2021/22.....87

Tabela 6. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja no estágio fenológico R2 e produtividade em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.....89

ANEXO

Tabela 1. Cepas dos microrganismos utilizados nos experimentos.....98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
HIPÓTESES	16
OBJETIVO GERAL	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1. A CULTURA DA SOJA NO AMBIENTE DE TERRAS BAIXAS	17
2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA SOJA E SUAS CARACTERÍSTICAS EM ÁREAS DE TERRAS BAIXAS	22
3. MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS COMO BIOINSUMOS	27
4. FORMAS DE APLICAÇÃO DE BIOINSUMOS	36
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 1. INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS NA CULTURA DA SOJA.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO 2. FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA SOJA CULTIVADA EM TERRAS BAIXAS	74
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXO.....	98

INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a principal aleuro-oleaginosa cultivada no mundo e atualmente é uma das alternativas com maior potencial de cultivo de grãos para a rotação com o arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) em ambiente de terras baixas no Estado do Rio Grande do Sul, ocupando uma área de 426.212 ha na safra 2021/22 (IRGA, 2022) e 505.965 ha na safra 2022/23 (IRGA, 2023). De modo que, verifica-se uma tendência de produtores multigrãos, com redução da área de arroz aliada à integração de outras culturas, para diversificação e fortalecimento do seu negócio.

O aumento da produção da leguminosa, especialmente em rotação com o arroz, é devido a três fatores principais: a valorização da soja no mercado nacional/internacional; a inviabilização de algumas áreas para o cultivo de arroz, devido à infestação de plantas daninhas e o surgimento de genótipos de soja adaptadas às condições edafoclimáticas desse ambiente (QUEVEDO et al, 2022). Proporcionando a melhoria nas condições de fertilidade do solo, controle mais eficiente de plantas daninhas, a quebra do ciclo de pragas e doenças, e principalmente à valorização econômica por maior fluxo de caixa ao produtor, visto que haverá duas culturas, com custos de lavoura e preços diferentes.

Entretanto, nesse novo ambiente de terras baixas, o crescimento e produtividade de grãos da soja podem ser afetados por algumas características intrínsecas destes solos, os quais são fatores limitantes para o adequado desenvolvimento da cultura, dentre eles, destaca-se a drenagem deficiente, a presença de camada subsuperficial compactada e a baixa condutividade hidráulica (SOSBAI, 2018).

A soja é uma cultura que possui baixa tolerância ao excesso hídrico, e os solos que ocorrem em terras baixas apresentam drenagem deficiente, com um lençol freático mais superficial, presença de horizonte B altamente impermeável e maior desestruturação e compactação nas camadas mais superficiais. Compactação oriunda da intensa utilização de tecnologias voltadas à mecanização das operações agrícolas, sem controle de tráfego, realizadas em condições de alta umidade do solo e também da superlotação de animais em propriedades que têm a pecuária como atividade (SARTORI et al., 2016).

Nesse sentido, essas limitações em atributos do solo podem interferir em diversos processos das plantas de soja. Dessa forma, é imprescindível a busca por alternativas que possam minimizar os impactos desses estresses junto com a manutenção e busca de alta produtividade de grãos das lavouras, seja no estado físico, químico e biológico. Uma das estratégias é a aplicação de microrganismos, que podem desempenhar um papel vital para as plantas durante o seu crescimento e desenvolvimento (ILANGUMARAN; SMITH, 2017).

Bioinsumos compostos por bactérias diazotróficas combinadas com bactérias simbióticas do gênero *Bradyrhizobium*, possibilitam a potencialização da nodulação e maior crescimento radicular em soja, em virtude da capacidade das primeiras em produzir fitohormônios, responsáveis pelo maior desenvolvimento do sistema radicular, proporcionando maior absorção de água e nutrientes, resultando em menores estresses hídricos e maiores produtividades (FINOTO et al., 2017).

Desse modo, a utilização desses microrganismos como bioinsumos é uma das práticas agrícolas fundamentais no momento de semeadura, onde a inoculação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e a coinoculação com demais bactérias, como as do gênero *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e fungos do gênero *Trichoderma* são alternativas para auxiliar no aumento do crescimento de raízes, nodulação e também na diminuição da incidência de doenças por patógenos do solo, nos estágios iniciais das plantas de soja (RONDINA et al., 2020).

Contudo, a forma de inoculação e de coinoculação dos microrganismos pode influenciar a eficiência destes, visto que a aplicação feita tradicionalmente via semente nem sempre é eficaz, podendo ser afetada pela umidade e temperatura do solo no momento da semeadura, pelo uso de produtos químicos no tratamento das sementes que podem causar toxidez à bactéria, dentre outros fatores (TOCHETO; BOIAGO, 2020).

Logo, métodos alternativos de aplicação podem ser vantajosos, por exemplo, a inoculação via pulverização no sulco de semeadura é uma opção para o bom estabelecimento desses microrganismos no solo (VIERA NETO et al., 2008). Portanto, se faz necessários estudos sobre o efeito destes microrganismos em solos de terras baixas e sobre a melhor forma de aplicação deles na cultura da soja, a fim de obter uma alternativa mais sustentável e um melhor estabelecimento dos microrganismos e da cultura.

HIPÓTESES

Capítulo 1:

- A inoculação simples de *Bradyrhizobium japonicum* apresenta respostas superiores quando comparada a plantas não inoculadas.
- A utilização de *A. brasilense* na coinoculação da soja, promove o sistema radicular das plantas com aumento na massa seca de raiz, volume de raiz e no número de nódulos.

Capítulo 2:

- A aplicação de microrganismos no sulco de semeadura proporciona maior

desenvolvimento radicular e crescimento das plantas em ambiente de terras baixas, elevando a produtividade dos grãos.

- A coinoculação de *B. japonicum* com o fungo *T. asperelloides* melhora o estabelecimento inicial das plântulas, promovendo menor morte de plantas por fungos patogênicos de solo.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com microrganismos multifuncionais na cultura da soja, e a melhor forma de aplicação destes via tratamento de sementes e sulco de semeadura em ambiente de terras baixas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A CULTURA DA SOJA NO AMBIENTE DE TERRAS BAIXAS

A cultura da soja é uma *commodity* agrícola indispensável para a produção mundial, sendo fonte de proteína vegetal na alimentação humana e animal (PEIRETTI et al., 2019). No cenário global, a produção da aleuro-oleaginosa está em constante avanço, apesar da ruptura de cadeias globais de suprimentos em função da pandemia da Covid-19 e das restrições estabelecidas para seu combate, provocando amplas flutuações de estoque e gargalos de produção que resultaram na elevação dos preços de diversos insumos para produtores e consumidores ao redor do mundo e da economia como um todo, que ainda se encontra em crescimento lento e envolta por uma série de crises. Tal cenário em 2022-23, ainda está atrelado à ocorrência de conflitos armados (Guerra Rússia-Ucrânia) e a crescentes tensões geopolíticas em regiões chave na produção de *commodities* (MANTOVANI et al., 2023).

No contexto nacional, o desempenho do agronegócio é suficiente para abastecer o mercado interno e gerar excedentes exportáveis, consolidando o Brasil como um importante fornecedor global de bens agropecuários (FGV, 2015), entre os quais se destaca a soja, cuja participação no mercado coloca o país entre os maiores exportadores mundiais. No Brasil, a soja começou a representar valor comercial em meados da década de 1960, com destaque produtivo inicial concentrado na região Centro-Sul, e com posterior expansão de fronteiras agrícolas no país, tornando-se a cultura de maior importância econômica (EMBRAPA, 2020).

A produção brasileira de grãos na safra 2022/23 pode chegar a 309,9 milhões de toneladas. Destes, aproximadamente 151,4 milhões de toneladas são resultantes das lavouras de soja, volume de 20,6% superior ao registrado em 2021/22, o qual obteve 125,5 milhões

(CONAB, 2023). Apontando uma recuperação na produtividade das lavouras as quais foram atingidas pelas condições climáticas adversas do último período, marcado por altas temperaturas advindas do fenômeno La Niña, ocasionando severos impactos.

A soja avança em todas as regiões do país, como por exemplo, em áreas de terras baixas, sendo este cultivo característico de poucos locais do mundo, assim como, no Sul do Brasil (GUBIANI et al., 2018). Isto, possibilitado por avanços nas pesquisas e tecnologias que permitiram a difusão de conhecimentos, experiências, proporcionando a adaptação do ambiente a essa espécie, fato cada vez mais frequente (EMBRAPA, 2020).

No Sul do Brasil, os solos de terras baixas são predominantemente cultivados com arroz irrigado ou pastagens nativas. Contudo, esses solos também apresentam aptidão agrícola para o cultivo de culturas ditas de sequeiro como soja, milho, sorgo e trigo, desde que, sejam implementadas práticas agrícolas necessárias, que compreendam questões de ordem física, química e biológica do solo, para o alcance de adequados níveis de produtividades com estas culturas (AGOSTINETTO et al., 2022).

No Estado do Rio Grande do Sul (RS), as terras baixas localizam-se na metade sul do estado e caracterizam-se pela heterogeneidade dos solos quanto a mineralogia e granulometria em função do material de origem, presença de relevo plano a suave ondulado, tendo como característica dominante a má drenagem e o hidromorfismo, provocando umidade excessiva (PINTO et al., 2004).

A condição de hidromorfismo, associada à baixa fertilidade natural e às limitações físicas comuns aos solos de terras baixas, dificultaram por muito tempo a implementação de uma agricultura diversificada e intensificada nestas áreas, que há muito está alicerçada no binômio arroz irrigado/pecuária de corte extensiva (SCIVITTARO, 2022). Dessa forma, há mais de um século no Sul do Brasil as terras baixas são utilizadas para a produção de arroz irrigado, principalmente pela disponibilidade e baixa infiltração de água e macroporosidade na camada do solo próximo à superfície (DENARDIN et al., 2019), características que favorecem a irrigação por inundação no arroz.

Além destas, estas áreas apresentam outras características intrínsecas, como a drenagem deficiente, lençol freático superficial, a presença de horizonte B altamente impermeável e maior desestruturação e compactação nas camadas mais superficiais. Essa compactação superficial ocorre em virtude da intensa utilização de tecnologias voltadas à mecanização das operações agrícolas, sem controle de tráfego, do adensamento do solo durante o preparo com alta umidade, e também devido a superlotação de animais em propriedades que têm a pecuária como atividade (SARTORI et al., 2016).

As terras baixas com todas estas particularidades já mencionadas, envolve aproximadamente 6,5 milhões de hectares no estado do Rio Grande do Sul (MIURA et al., 2015), dos quais 1 milhão de hectares eram cultivados anualmente com arroz irrigado (CONAB, 2020). Atualmente, de acordo com dados do Instituto Rio Grandense do Arroz, a área total semeada com arroz na safra 2022/2023 no Estado foi de 839.932 hectares, tendo uma redução de 12,2% em relação à safra passada (957.185 ha) (IRGA, 2023).

Esses dados, além de representarem a magnitude econômica e social da agricultura das terras baixas do RS, revelam um enorme potencial de expansão das atividades produtivas, seja aumentando a área cultivada com arroz, seja utilizando-a para produção de outras culturas de grãos, como soja, milho, trigo, além de forrageiras, carne e leite. Porém, para a cultura do arroz, observa-se um comportamento distinto nos últimos anos, caracterizado pela diminuição da área cultivada (IRGA, 2021), sobretudo, em razão da baixa rentabilidade alcançada pela cultura, comprometendo seriamente a sua sustentabilidade.

Redução também favorecida pela monocultura do arroz irrigado, a qual favoreceu o aumento da pressão de plantas daninhas e a seleção de plantas daninhas resistentes ao principal herbicida utilizado no sistema de produção de terras baixas, reduzindo significativamente a produtividade de grãos e inviabilizando o cultivo de arroz em muitas fazendas do Sul do Brasil (CONCENÇO et al., 2017). Aliado a isto, está a crescente alta dos custos de produção.

Logo, a introdução da cultura da soja foi influenciada inicialmente pela necessidade de reduzir a infestação de plantas daninhas, especialmente arroz-daninho e capim-arroz, resistentes principalmente a herbicidas inibidores da ALS (acetolactato sintase) e a elevação do preço pago pelo produto (AGOSTINETTO et al., 2022). Posteriormente, além da sua contribuição para a elevação da renda da propriedade, ela é responsável por este novo momento de revitalização das lavouras de arroz.

Posto isto, uma solução para a problemática da lavoura arrozeira passa pela diversificação do sistema de produção em terras baixas, com a implementação de sistemas integrados de produção agropecuária, incluindo a inserção da soja e a rotação de culturas (SILVA et al., 2020). Nesse sistema, o arroz e a soja são cultivados sequencialmente na mesma lavoura, com uma safra por ano.

Áreas tradicionais de produção de arroz têm sido cada vez mais utilizadas para o cultivo de soja, sob o incentivo principal dos preços favoráveis alcançados pela oleaginosa no mercado internacional e a estabilidade do mercado comprador. Assim, a área de soja em terras baixas passou de 11.150 ha na safra 2009/2010 para 505.965 ha na safra 2022/2023, um

incremento de 45 vezes o valor inicial de área cultivada, representando atualmente um percentual de 60,2% da área de arroz em rotação com soja (IRGA, 2023).

Contudo, existem vários desafios para que o cultivo da soja seja economicamente viável e rentável nestas áreas. Os principais fatores limitantes são a topografia predominantemente plana, solos hidromórficos que limita fortemente a drenagem da água, o alto grau de compactação em subsuperfície e a baixa capacidade do solo de realizar trocas gasosas em profundidade. Nesse contexto, a escolha do local (risco de inundação), relacionado à sua adequação por meio do nivelamento superficial, da necessidade de aprimorar tanto a macro como a micro drenagem de superfície e da correção do pH, surgem como os primeiros aspectos técnicos a serem observados (MARCHESAN, 2022).

Desse modo, há a necessidade de organizar/sistematizar as áreas, em seguida utilizar ferramentas que possibilitem o rompimento de ao menos parte da camada de maior restrição física do solo, para que a partir disso, outras práticas de manejo possam se expressar em seu máximo potencial (adubação, escolha de cultivares, tratamentos fitossanitários, inoculação, dentre outras) e, além disso, buscar aumentar o potencial de produção com a automatização das atividades da área, minimizando riscos e perdas (COELHO, 2022).

Portanto, as propriedades físicas do solo que favorecem os arrozais podem aumentar o risco de excesso ou déficit de água no solo, limitando a aeração do solo, a fixação biológica de nitrogênio e a disponibilidade de água, diminuindo a produtividade da soja em terras baixas (GUBIANI et al., 2018). Logo, estratégias que contribuem para melhores condições de desenvolvimento da soja são imprescindíveis.

Segundo Fleck et al (2023), características físicas próprias do solo de terras baixas podem ser trabalhadas para um melhor estabelecimento da soja nesse ambiente, inicialmente com um rompimento da camada compactada com a escarificação do solo, com a utilização da irrigação proveniente do sistema já consolidado do arroz irrigado e o cultivo sobre sulco-camalhão ou uso de sulcador na plantadora em linha, são táticas importantes e que devem ser consideradas (GIACOMELI et al., 2022).

Nesta linha de pesquisa, tecnologias têm sido adotadas mais recentemente pela comunidade em geral, a fim de minimizar os estresses nesses ambientes e elevar a produtividade de grãos de soja de forma sustentável, com a utilização de RTK (*Real Time Kinematic*) e do sistema de cultivo da soja em sulco-camalhões, facilitando a drenagem e reduzindo o uso de água para a irrigação. Sistema este que se manejado de forma adequada, permite uma maior oxigenação contribuindo para nodulação, fixação biológica do nitrogênio e a produtividade da soja em áreas de rotação com arroz irrigado (MARCHESAN, 2016).

A oxigenação do solo no ambiente radicular é de suma importância para a cultura da soja nesse ambiente, visto que a soja nesse ambiente de terras baixas é rotacionada com o arroz irrigado. Sendo que a hipóxia causada por inundações em arrozais irrigados, onde a camada de água reduz a difusão de oxigênio no solo cerca de 10.000 vezes em comparação com a atmosfera (PONNAMPERUMA, 1972), reduz o potencial redox (CARLOS et al., 2015) e, conseqüentemente, a atividade bioquímica da microbiota do solo (PANDEY et al., 2014).

Além de afetar a atividade metabólica do solo, o cultivo de arroz durante a inundação causa inúmeras alterações redox no solo que modificam completamente a comunidade microbiana do solo (TIAN et al., 2022). Uma diminuição drástica no teor de oxigênio do solo e uma redução significativa no potencial redox podem reduzir drasticamente a diversidade da comunidade microbiana do solo (TIAN et al., 2022), modificando o ambiente e podendo afetar diretamente as condições microbianas para o estabelecimento da rotação com a soja e da simbiose com microrganismos para a FBN da leguminosa.

Logo, é imprescindível ressaltar que a inserção dessa cultura nestas áreas se deve ao trabalho de um manejo integrado, realizado tanto na parte física do solo, como já mencionado, sobretudo para a melhoria do ambiente radicular. Na química, com a correção e adubação do solo para a elevação de níveis aceitáveis dos teores de nutrientes. E pelo manejo biológico do solo, com a utilização de microrganismos benéficos como forma de diminuir gradativamente os problemas que afetam a lavoura e potencializar efeitos na microbiota do solo e a interação destes com a rizosfera das plantas.

Toda essa conjuntura possibilita e favorece o cultivo da soja nestas áreas, que ao contrário do arroz, não possui aerênquimas em seu sistema radicular, sendo assim não consegue tolerar períodos prolongados de alagamento do solo. De modo que, sem técnicas e um manejo assertivo, a restrição do crescimento do sistema radicular das plantas de soja, entre outros parâmetros, pode afetar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (AMARANTE; SODEK, 2006), a condutância estomática (MADHU; HATFIELD, 2014), a absorção de água e nutrientes, e rendimento de grãos (WANG et al., 2019).

Em suma, apesar das limitações, a diversificação de culturas é uma prática necessária que contribui para o aumento da diversidade do agroecossistema, estoques de carbono, disponibilidade de N, biomassa microbiana, atividade enzimática extracelular, diversidade microbiana do solo e, principalmente, aumento da produtividade de grãos (CARLOS et al., 2022). Portanto, a soja é a principal cultura alternativa a ser utilizada pelos produtores gaúchos nestas áreas de terras baixas, beneficiando todo o sistema (arroz-soja-ambiente-

produtor), rotacionando modo de ação de herbicidas, manejando a resistência de plantas daninhas, reciclando nutrientes, intensificando e diversificando a produção de forma sustentável e economicamente viável na propriedade rural.

2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA SOJA E SUAS CARACTERÍSTICAS EM ÁREAS DE TERRAS BAIXAS

Bastante exigente em nutrientes, a soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo. No Brasil, a cultura contribui significativamente para a expansão da fronteira agrícola do País. Logo, a demanda nutricional para toda essa produção, no grão de soja é alta, sendo necessário fósforo, potássio, cálcio e micronutrientes bem balanceados. Mas, como, na sua composição, a proteína tem uma alta participação de 35% a 40%, o nitrogênio (N) representa o nutriente de maior volume (FRANCO; DÖBEREINER, 1994).

O nitrogênio é, portanto, um nutriente que as plantas requerem em maiores quantidades e com mais frequência, sua baixa disponibilidade é um fator limitante na produção agrícola. Isso se deve ao seu papel desde a fundação da vida na composição de ácidos nucléicos (DNA e RNA), aminoácidos e proteínas, além de algumas moléculas necessárias à vida, como a clorofila (TAIZ et al., 2017).

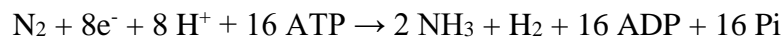
Entretanto, a disponibilidade de nitrogênio é limitada em muitos solos, especialmente nos trópicos, e embora a atmosfera da Terra seja composta por 78% de gás nitrogênio (N₂), este não está em uma forma assimilável para plantas ou animais. Contudo, o N pode ser obtido por meio de quatro fontes: 1 - o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2 - a fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; (sendo estas duas primeiras fontes, praticamente insignificantes), 3 - fertilizantes nitrogenados; e 4 - processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂). Dessa maneira, a terceira fonte é a mais utilizada, isto como resultado da Revolução Verde, onde desde a década de 1960 a agricultura moderna depende fortemente de fertilizantes industriais à base de N (HUNGRIA et al., 2007).

No entanto, o processo Haber-Bosch para a síntese de fertilizantes nitrogenados requer muito consumo de combustíveis fósseis para atingir a alta temperatura e pressão necessária para quebrar a ligação tripla entre os átomos de N₂. Além disso, durante a síntese, transporte e uso de fertilizantes, é liberado dióxido de carbono (CO₂), e a eficiência da planta é de apenas 30 a 60%, o que leva perdas por lixiviação e emissão de óxidos de nitrogênio, como o óxido nitroso (N₂O), que é 292 vezes mais ativo como gás de efeito estufa do que o dióxido de carbono (HUNGRIA et al., 2007; HUNGRIA et al., 2013).

Mesmo assim, vários países utilizam e importam a maior parte dos fertilizantes nitrogenados usados na agricultura, por exemplo, 80% do nitrogênio no Brasil, criando uma dependência externa vinculada a moedas estrangeiras. Essas limitações acarretam altos custos econômicos, severos e significativos problemas ambientais, demandando estratégias para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados (BOHLOOL et al. 1992; DÖBEREINER, 1994; SPRENT; SPRENT, 1990).

Visto isso, quando a soja foi introduzida no País, em meados do século passado, os primeiros estudos nutricionais do seu cultivo já apontavam a necessidade do uso do nutriente. No caso da leguminosa, as duas formas de melhor suprimento de N, é por meio do uso de adubos minerais e da fixação biológica de nitrogênio.

Esta última é um fenômeno natural, onde há bilhões de anos atrás com a evolução da Terra e conseqüentemente dos procariotos, bactérias, arqueia, ou seja, microrganismos que habitam o solo começaram a sintetizar uma enzima denominada nitrogenase, induzida pelos genes NIF e FIX. Essa enzima que catalisa as reações de redução N₂ a amônia (NH₃), e se mantém conservada até os dias de hoje, sendo capaz de quebrar a tripla ligação do N₂ e transformá-lo em amônia (NH₃), processo denominado como fixação biológica do nitrogênio (FBN) (SPRENT; SPRENT, 1990; EVANS; BURRIS, 1992), conforme a seguinte reação:



O conjunto básico de genes responsáveis pela síntese do complexo enzimático e da atividade da nitrogenase, denominados genes *nif* e *fix*, foi transferido horizontalmente para outros procariotos, que atualmente são denominados como diazotróficos (di = dois, azoto = nitrogênio; trófico = relativo à alimentação), estando presente em diversas espécies de bactérias e arqueias, habitando todos os ecossistemas terrestres e os oceanos (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2013). Essas bactérias, denominadas como diazotróficas ou fixadoras de N₂, se associam a diversas espécies de plantas, em diferentes graus de interação, nas proximidades das raízes (rizosféricas), ou em relações mais íntimas (endofíticas), levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas.

Todavia, apesar da descoberta e a tendência pela opção da FBN para disponibilização de N para a soja, havia na época a onda da Revolução Verde, onde o uso de fertilizantes químicos influenciou fortemente a agricultura moderna. Ademais, acreditava-se que a FBN fornecia apenas uma pequena proporção do nitrogênio exigido pela soja, sendo necessária a adição química. Apenas, por volta da década de 70, pesquisas na agricultura brasileira, identificaram bactérias associativas capazes de quebrar a tripla ligação entre os átomos de nitrogênio, transformando-o numa forma assimilável pelas plantas (FAGAN et al., 2007).

Em estudos realizados posteriormente demonstraram que esta associação é capaz de suprir toda a demanda por nitrogênio na cultura da soja (HUNGRIA et al., 2001). Esse fato reduziu os custos de produção no sistema brasileiro, garantindo maior lucratividade com amenização dos impactos ambientais e tornando a FBN um dos pilares de sustentabilidade do sistema de produção de soja no Brasil.

Nesse sistema, as bactérias que pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* associam-se com a soja através de simbiose (FAGAN et al., 2007). Porém, como a soja não é nativa do Brasil, os solos não abrigam naturalmente estirpes compatíveis dessas bactérias, de modo que, em áreas de primeiro cultivo, a nodulação é zero ou próxima de zero (HUNGRIA et al., 1994).

Atualmente existe uma vasta documentação na literatura a respeito da nodulação em áreas novas, esta que também pode ser confirmada com técnicas mais avançadas de biologia molecular (FERREIRA; HUNGRIA, 2002). Frente a isso, outras estirpes simbioses da soja foram trazidas do exterior, principalmente de universidades norte-americanas e, posteriormente, da Austrália, para avaliação nas condições edafoclimáticas e com genótipos de soja utilizados no país.

No momento atual no Brasil, as estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas e que possuem maior eficiência na FBN, para a cultura da soja, são *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5009), *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) (CÂMARA, 2014). Porém, por não serem nativas em solos brasileiros é necessário realizar a inoculação destas estirpes nas sementes da cultura, principalmente em solos onde nunca receberam inoculantes.

Dessa forma, a inoculação adequada nas sementes de soja fornece bactérias diazotróficas na quantidade e qualidade necessárias para o estabelecimento precoce da simbiose (HUNGRIA et al., 2017), uma vez que a população estabelecida no solo pode ser fisiologicamente limitada por diversos fatores ambientais.

Assim sendo, a inoculação com determinadas linhagens aumenta o número de bactérias fisiologicamente ativas e eficientes na realização da FBN, estimulando a rápida formação e ocupação de nódulos, o que resulta em mais N fixado à planta. Sendo que a inoculação deve fornecer pelo menos 1,2 milhão de unidades formadoras de colônias (UFCs) por semente, das quais 80.000 a 100.000 devem ser recuperadas no momento da semeadura (HUNGRIA et al., 2017). Este é um número considerado suficiente para promover uma adequada nodulação radicular da soja em áreas com população estabelecida de *Bradyrhizobium*.

Além disso, estima-se que para produzir 1.000 kg de grãos de soja sejam necessários

80 kg de N, dos quais 65 kg são exportados e 15 kg são utilizados no desenvolvimento estrutural da planta (SEIXAS et al., 2020). Logo, as bactérias realizando a FBN, pode suprir até 94% do N total necessário para o desenvolvimento da soja, garantindo ganhos econômicos pela não utilização de fertilizantes nitrogenados, os quais implicariam em gastos em torno de US\$ 15 bilhões de dólares a cada safra (HUNGRIA; MENDES, 2015). É um processo complexo, a simbiose entre *Bradyrhizobium* spp. e a soja, envolve a expressão de genes específicos da planta e da bactéria e uma troca de sinais altamente coordenados entre eles. (HUNGRIA; STACEY, 1997; WEI et al., 2008; PASSAGLIA, 2017).

Feita a inoculação da bactéria na soja e está semeada, ocorre à germinação dessas sementes e as raízes da planta passam a exsudar polissacarídeos, principalmente flavonoides genisteína e daidzeína na rizosfera, que são reconhecidos pela bactéria, desencadeando a produção de lipoquitooligossacarídeos (LCO's), conhecidos como fatores Nod (LIU; MURRAY, 2016).

De modo que, com esses sinais da bactéria para a planta inicia-se a simbiose, atraindo a bactéria (rizóbios inoculados) para o córtex da raiz da planta (KIJNE, 1992; SHARMA et al., 2020), ocorrendo em seguida, estímulos ao crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e a ativação de diversos genes da bactéria responsáveis pelo início da nodulação, resultando em uma estrutura característica, o nódulo (DESBROSSES; STOUGAARD, 2011).

A formação de nódulos radiculares leva à fixação e assimilação do N pela planta (REIS, et al., 2011). De modo que, nos nódulos radiculares, o N₂ atmosférico é convertido em NH₃ e posteriormente em NH₄⁺ (MULDER et al., 2002, BARAL et al., 2014). Em troca, a planta hospedeira fornece ácidos dicarboxílicos (por exemplo, malato) (UDVARDI; DAY, 1997) como fonte de carbono e energia para as bactérias fixadoras.

Na soja, os produtos finais da FBN são transportados principalmente para a parte aérea como ureídeos, como alantoína e ácido alantóico (BARAL et al., 2016). A quantidade de ureídeos no tecido vegetal aumenta ao longo do ciclo da planta, com pico entre R3 e R5, diminuindo em R7 (OSBORNE; RIEDELL, 2011; ZAPATA et al., 1987), e sua abundância relativa no xilema da planta é considerada um indicador da atividade da FBN (DURAN; TODD, 2012).

Outro indicador da FBN, que representa um marcador visual de que a FBN está ativa, é a leg-hemoglobina, uma hemoproteína responsável pelo fino ajuste das necessidades específicas de oxigênio dos nódulos, a qual fornece ao nódulo uma coloração rosada no seu interior, indicando que esse está em plena atividade (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Visto a complexidade da FBN ao longo do ciclo da cultura, há também constantes formações e renovações dos nódulos no sistema radicular da planta, contribuindo para que o processo de formação até o estabelecimento da bactéria e realização da FBN seja bastante responsivo a vários agentes do meio. Segundo Martin et al, (2022), alguns dos principais fatores que interferem nessa eficácia são acidez do solo, altas temperaturas (DEAK et al., 2019), baixa fertilidade e disponibilidade de água do solo (DEAK et al., 2019; STECCA et al., 2019) e compatibilidade entre tratamento de sementes e inoculantes (SILVA et al., 2018).

Outro fator que pode interferir e limitar a FBN e o estabelecimento da soja em terras baixas é o encharcamento, o excesso de umidade, muito característico desse ambiente, este que impacta com perdas de cerca de 30 e 50% na FBN, diretamente no número e massa dos nódulos, com as maiores reduções nas fases reprodutivas (GARCIA et al., 2020).

A atividade da nitrogenase é drasticamente reduzida com excesso de água. Na fotossíntese as perdas também são de cerca de 30 a 50%, principalmente relacionado à redução da condutância estomática e baixo status de N. A soja também pode desenvolver tecido aerênquimatoso nas raízes, hipocótilos e nódulos, o que pode aliviar a anóxia gerada pelo encharcamento, facilitando o transporte de oxigênio (PLOSCHUK et al., 2022). Desta maneira, é preciso que mais esforços sejam feitos na investigação dos efeitos do estresse hídrico pelo encharcamento na nodulação e no impacto e subsequente recuperação do crescimento radicular.

Além disso, embora os benefícios da inoculação anual sejam comprovados, muitos agricultores ainda não utilizam tal prática, por observarem que em áreas cultivadas por várias safras consecutivas ocorre a formação de nódulos nas raízes da soja pela população estabelecida de *Bradyrhizobium* no solo, mesmo sem inocular. Entretanto, ao não usar inoculante nessas áreas o produtor deixa de ganhar em produtividade (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2020).

Diante disso, é imprescindível ressaltar a importância da reinoculação anual, pois esta prática possibilita a renovação qualitativa e quantidade dos rizóbios nos sistemas de produção, provindo das doses aplicadas de inoculantes. Pois, a população remanescente de rizóbios, na ausência do hospedeiro principal durante o período da entressafra, sobrevivem alternativamente como decompositores de matéria orgânica, competindo com outros organismos nativos do solo. Em um ambiente agrícola restritivo à sobrevivência, com condições desfavoráveis a esses microrganismos e diversos estresses ambientais como frio e seca, que são condições típicas de entressafra em muitas regiões. Resultando na perda do potencial de eficiência na FBN, apesar de nodular algumas raízes de soja na próxima safra

(CÂMARA, 2018).

Logo, apesar das pesquisas, validações e desenvolvimento tecnológico com a FBN na cultura da soja completarem mais de 100 anos no Brasil, sendo atualmente líder mundial em contribuição da FBN na agricultura, liderança que foi conquistada com a cultura da soja (HUNGRIA et al., 2022). Há a necessidade constante de levar essas informações da pesquisa, de maneira mais assimilável para o produtor, a fim de que ele possa aderir as tecnologias de forma prática no seu dia a dia, principalmente no tocante da soja em terras baixas, onde o ambiente influencia significativamente o estabelecimento da cultura.

3. MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS COMO BIOINSUMOS

O Brasil é um país modelo quando se trata do uso de microrganismos benéficos na agricultura. Sendo cada vez mais constante a busca por tecnologias biológicas eficientes no agronegócio, voltadas para sistemas agrícolas sustentáveis, sobretudo para a redução de riscos/impactos negativos ao meio ambiente e maiores incrementos de produtividade de forma sustentável, preservando a natureza, e participando efetivamente do crescimento do mercado, o qual está cada vez mais globalizado e competitivo (HUNGRIA et al., 2022).

Porém, o modo de produção agrícola, pautado por décadas de monocultivo contribui de maneira decisiva para a redução da diversidade microbiana nos sistemas. É preciso “repovoar” os solos constantemente com microrganismos que beneficiem as culturas agrícolas, e fortalecer a entrada destes nos sistemas ao longo de várias safras (FEITOZA, 2023).

Cada microrganismo tem a capacidade de desempenhar funções específicas e quando atuam em conjunto podem favorecer a proteção e o desenvolvimento das diversas culturas, utilizando diversos mecanismos. Cabe salientar que não é apenas uma única espécie, cepa, que possui todos os mecanismos que beneficiam o solo e as culturas, sendo que, quando se fala de funcionalidade dos microrganismos também considera se a biodiversidade (HUNGRIA et al., 2022).

A utilização de microrganismos beneficia diretamente o crescimento e desenvolvimento de plantas em decorrência das suas funções específicas com a produção de fitormônios e sideróforos, suprimento de nutrientes e assimilação de nitrogênio atmosférico (N₂); bem como, indiretamente, por proteger as plantas contra patógenos, de modo que apresentam características multifuncionais (MSIMBIRA; SMITH, 2020). Logo, a escolha dos microrganismos a serem utilizados em determinada cultura, solo, clima, região, deve ser ponderada, e feita com cautela, levando o critério do objetivo/problema que se deseja

resolver.

Desse modo, a identificação do objetivo ou do problema a ser solucionado é o primeiro elemento que deve ser atentado para selecionar um microrganismo ou um conjunto deles que se adapte e resolva melhor o problema em questão, buscando uma maior assertividade. Conseqüentemente, os bioinsumos possibilitam "personalizar" soluções de acordo com as diferentes demandas de uma maneira eficiente e sustentável (FEITOZA, 2023).

Além disso, o uso simultâneo de diferentes microrganismos benéficos, definido como coinoculação ou consórcio de microrganismos, vem ganhando espaço no mercado, pois combina diferentes mecanismos de ação, produzindo potenciais efeitos sinérgicos, quando comparado à utilização de microrganismos isoladamente (FLAUZINO et al, 2018).

Desse modo, há mais de 400 milhões de anos a uma associação entre plantas e microrganismos; sendo que existe registro fóssil que apoia o estabelecimento de interações entre plantas e certos fungos, como a micorriza arbuscular. Em associações planta-bactéria, pode não haver registro fóssil, devido à sua frágil natureza unicelular (LEMANCEAU et al, 2017; KRINGS, 2007). Entretanto, essa associação é esperada, uma vez que os microrganismos surgiram antes das plantas e colonizaram a maior parte dos ecossistemas do planeta. Assim, as plantas podem ter encontrado microrganismos e, desde então, formado associações simbióticas e comensais (JAVAUX, 2006).

Nesse sentido, desde tempos remotos, diversos grupos de microrganismos começaram a estabelecer comunicações químicas e físicas, onde plantas multicelulares e maiores permitiram que microrganismos selecionados se estabelecessem e colonizassem seus compartimentos internos, como raízes, caules e folhas (UPSON et al, 2018). De acordo com a teoria simbiótica de Margulis, certas populações chegam a produzir organelas como cloroplastos e mitocôndrias (LAZCANO; PERETÓ, 2017). Visto isto, uma analogia que pode ser feita é entre os microrganismos e as redes sociais, onde ambos são capazes de estabelecerem diversos sinais, diretos e indiretos e conexões simultaneamente em vários compartimentos.

Atualmente, a microbiota do solo vem sendo cada vez mais estudada principalmente por funções importantes em que desempenha nos ecossistemas, tais como: (1) sustentabilidade social e ecológica, (2) adaptação e mitigação das mudanças climáticas, (3) como um recurso biotecnológico para os seres humanos, (4) ciclagem da água e nutrientes, e (5) aumento da produção de alimentos (KALIA; GUPTA, 2005; PAJARES et al., 2016).

Contudo, a população da comunidade microbiana do solo varia de acordo com a espécie vegetal; além disso, a liberação de exsudatos provindos da raiz pode causar alterações

químicas e físicas na rizosfera, o que beneficia ou inibe o crescimento microbiano nessa região. Assim, a comunidade microbiana na rizosfera é maior que a do rizoplano (MCNEAR JUNIOR, 2013)

Desse modo, as regiões mais próximas das raízes, principalmente a rizosfera e o rizoplano, são locais preferenciais para a colonização microbiana, sendo essa preferência associada à sinalização molecular entre plantas e microrganismos (por exemplo, mediada por flavonoides ou isoflavonoides) ou devido à alta disponibilidade de nutrientes provenientes dos exsudatos radiculares, contribuindo com o metabolismo e a multiplicação de células microbianas (BALDANI et al., 1997; MEDEIROS et al., 2006, DRIGO et al., 2010).

Esse fato tem dado suporte ao desenvolvimento de diversos estudos sobre a diversidade microbiana da rizosfera, visto que é um habitat variável, que tem sua composição e estrutura afetadas ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas (TERRA et al., 2019; COCKING, 2003; KANG; MILLS, 2004; PHILIPPOT et al., 2013).

Portanto, a rizosfera é a zona de contato entre solo e raízes, onde ambos são mutuamente influenciados, sendo um ponto de alta diversidade de organismos, constituindo-se um ecossistema complexo, onde são encontradas bactérias, fungos, oomicetos, nematoides, protozoários, algas, vírus, artrópodes e archaea (HINSINGER; MARSCHNER, 2006).

Os organismos da rizosfera são geralmente estudados devido a sua relação de efeitos benéficos na sanidade e crescimento das plantas e principalmente pelos mecanismos de ação direta ou indireta que apresentam, regulando crescimento e produtividade por meio do aumento da tolerância ao estresse abiótico e biótico, nutrição das plantas e antagonismo contra agentes fitopatogênicos (SANTOYO et al., 2019).

Estes organismos são classificados como: bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos, rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (RPCP), organismos de controle biológico, entre outros, que propiciam uma alta densidade de microrganismos ao redor das raízes (KAUR et al., 2019). Entretanto, apesar dessa alta abundância nessa zona, a biodiversidade ao redor das raízes não é tão alta quanto no restante do solo (BERG; SMALLA, 2009). Sendo necessário “repor” microrganismos por meio da inoculação, coinoculação e aplicações.

As principais RPCP, dentre as conhecidas e que são usadas na agricultura, são formadas pelos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Bacillus*. Dentre estas, o gênero *Bradyrhizobium* é o mais onipresente nos solos (SHAH; SUBRAMANIAM, 2018). Para a cultura da soja as bactérias *Bradyrhizobium* são imprescindíveis, elas são gram-negativas, com uma estrutura regular e oval, fixadoras de N₂, que ao infectarem as raízes das plantas

hospedeiras (leguminosas) formam nódulos (tumefações), mantendo uma relação de simbiose, essencial para o processo de fixação biológica de nitrogênio, como já mencionado no item anterior. Visto que, com esse processo da FBN, não há necessidade do fornecimento de fertilizantes nitrogenados para a cultura da soja devido à associação simbiótica com essas bactérias (HUNGRIA; MENDES, 2015; DELAMUTA et al., 2013).

Além da fixação biológica de nitrogênio as bactérias do grupo *Bradyrhizobium* possuem papel fundamental em outras atividades. Exemplo disso são as cepas de *Bradyrhizobium japonicum* conhecidas por produzir hormônios vegetais e precursores hormonais, incluindo aqueles associados com as principais vias de sinalização vegetal de auxina, etileno e ácido abscísico (BOIERO et al. 2007; HODGE et al. 2009).

De acordo com Shi et al. (2010) e Spaepen et al. (2007), a estimulação do crescimento radicular por parte das RPCP pode ser o resultado advindo de compostos voláteis ou difusíveis, produzidos pelos microrganismos, que servem como fitohormônios, precursores ou outros sinais que afetam a reprogramação genética da célula hospedeira e consequente promoção do crescimento.

Em outros estudos com *B. japonicum*, Mercedes et al. (2022) demonstra a influência da bactéria sobre a reprogramação transcricional do hospedeiro durante a interação da planta com este microrganismo benéfico e as subsequentes alterações na arquitetura do sistema radicular. No trabalho realizado por Rolim et al. (2019), comparando as bactérias *B. diazoefficiens*, *B. japonicum* e *B. elkanii* no solo em reinoculação no segundo até sexto ano, verificaram que a maior nodulação de raízes foi obtida com a utilização de *B. japonicum*. Desse modo, essa bactéria é de suma importância pelos benefícios que gera e apresenta variações entre as espécies e cepas do mesmo gênero.

As bactérias do gênero *Azospirillum*, também possui a habilidade de fixar nitrogênio atmosférico, a associação com as plantas ocorre na rizosfera, porém é menos especializada, conseguido suprir apenas uma pequena parte das necessidades da planta. Por outro lado, as estirpes de *A. brasilense* selecionadas no Brasil se destacam como fortes produtoras de fitormônios, particularmente ácido indolacético (AIA), com grande capacidade de promoção de crescimento das raízes, incrementando a absorção de água e nutrientes pelas plantas e resultando em melhorias nos aspectos nutricionais e de tolerância a estresse hídrico, e possibilitando a exploração de maior volume de solo (SANTOS et al., 2021).

Dessa forma, o principal hormônio produzido por estirpes deste gênero é a auxina, o AIA, citocininas e giberelinas. Pelo menos três vias biossintéticas foram descritas na produção de AIA em *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, como a via indole-3-a-

cetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e uma outra independente. O triptofano é o precursor da auxina (AIA), ou seja, essencial para a síntese de auxina. As principais funções das auxinas são alongamento das células vegetais, dominância apical, fototropismos e formação de raízes (LEBUHN; HARTMANN, 1993).

Estudos sobre a inoculação com *Azospirillum* têm evidenciado efeitos benéficos para as plantas, obtendo aumento de produtividade de 6,6% (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). Na soja, a coinoculação com *Bradyrhizobium spp.* e *A. brasilense* (cepas Ab-V5 e Ab-V6) pode melhorar a nodulação da soja, a produtividade, o teor de N nos grãos e a tolerância à restrição hídrica moderada (HUNGRIA et al. 2013, 2015; CEREZINI et al. 2016; REGO et al. 2018; SILVA et al. 2019; RONDINA et al. 2020). Ainda, de acordo com Rego et al. (2018), a coinoculação da bactéria *A. brasilense* nas sementes da soja, ocasiona maior altura da planta, maior número de vagens por planta, maior número de sementes por planta e maior produtividade de grãos (719,41 kg ha⁻¹) em relação à testemunha.

O gênero *Bacillus* é outro grupo de bactérias predominante no solo, são aliadas da produção agrícola sustentável, pois além de controlar diversas pragas de plantas, também atuam como promotores de crescimento vegetal (KUMAR et al., 2011; BORRISS, 2015; SANSINENA, 2019). Sendo que várias espécies desse gênero foram relatadas em diversos nichos ecológicos, como a ciclagem de nutrientes, proteção contra patógenos, auxiliando as plantas a tolerarem estresses abióticos, dentre outros (SAXENA et al., 2020).

O *Bacillus megaterium*, por exemplo, oportuniza a expressão de genes de defesa em plantas de soja, sendo um agente de biocontrole de nematoides do cisto da soja (*Heterodera glycines*) nas raízes da cultura, sendo está uma das pragas mais devastadoras da produção da soja em todo o mundo (ZHOU et al., 2021). Ainda de acordo, com suas pesquisas de campo, Zhou et al. (2017) afirmam que o revestimento de sementes de soja, por meio de *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium* e *Sinorhizobium fredii*, reduzem a reprodução de nematoide do cisto da soja e promovem o crescimento e a produtividade das plantas de soja. Chihaoui et al. (2015) também reforça que a inoculação com a bactéria *Bacillus megaterium* também induz a nodulação e o crescimento da leguminosa.

Similarmente, espécies de *Bacillus subtilis* têm um efeito benéfico sobre a nodulação, (ARAÚJO et al., 2010) agindo, também, indiretamente na supressão de doenças e diretamente na produção ou alteração da concentração de fitohormônios, fixação do nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, pelo aumento da produção de raízes e sideróforos (GAGNÉ-BOURQUE et al., 2015). Podendo promover aumento na produtividade de grãos, especialmente quando associados a outras práticas de manejo

(BRAGA JUNIOR et al., 2018).

Além disso, as espécies de *Bacillus* podem restringir o crescimento de patógenos através da produção de lipopeptídeos como fengycina, surfactina e iturina. E como uma RPCP, pode também sintetizar enzimas líticas, como glucanases ou celulases, que são capazes de degradar as membranas de fungos fitopatogênicos (FIRA et al. 2018; LAHLALI et al. 2011). Ademais, o gênero *Bacillus* é um dos táxons bacterianos que mais aumentaram sua abundância relativa, principalmente com membros, como *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. senegalensis*, *B. subtilis*, *B. firmus*, *Paenibacillus koreensis*, dentre outros. Estas espécies de *Bacillus* têm sido amplamente relatadas como RPCP.

As bactérias *Pseudomonas* spp. são outras bactérias que tem sido amplamente estudadas por seus metabólitos promotores de crescimento e antimicrobianos. Esse gênero é capaz de produzir uma gama de metabólitos secundários envolvidos na supressão de fitopatógenos e possui a capacidade de estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio, produção de enzimas hidrolíticas, hormônios reguladores e solubilização de minerais inorgânicos (SHAHID et al., 2018).

Além disso, segundo a revisão de Shahid et al. (2018) também há relatos de efeitos apoptóticos, antimetabólicos, nematocidas, herbicidas, anti-helmínticos, inseticidas e efeitos fitotóxicos em aplicações agrícolas e farmacêuticas bem-sucedidas. Outros trabalhos demonstram que bactérias do gênero *Pseudomonas* têm capacidade de produzir enzimas (fosfatases ácidas) que agem disponibilizando o fósforo (P) ligado à matéria orgânica e ácidos orgânicos que podem agir disponibilizando o P pouco solúvel ligado a compostos de ferro (Fe) e alumínio (Al) (BOLAN et al., 1997).

Sharma et al, (2013) ressalta que os principais mecanismos de solubilização de P exercidos pelos microrganismos do solo incluem: liberação de complexos ou compostos de dissolução mineral, por exemplo, ácidos orgânicos, sideróforos, liberação de enzimas extracelulares e a liberação de P durante a degradação do substrato. E em trabalho conduzido por Pommorsky (2015), na busca de novas biotecnologias para o sistema produtivo da soja, este concluiu que a coinoculação de *P. fluorescens* associadas à rizóbios, foi eficiente na nodulação, desenvolvimento e rendimento de grãos da cultura.

Portanto, as RPCP possuem uma capacidade de promover crescimento, como também de induzir mecanismos de defesa das plantas que causam resistências sistêmicas aos ataques dos patógenos (HUNGRIA, 2022). Os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* tem capacidade de controlar muitas doenças fúngicas e bacterianas, além de reduzir a infestação de nematoides dos solos (SUN et al., 2017). Com base nessas ações, a produção de soja é cada

vez mais aperfeiçoada, de forma sustentável, promovendo o crescimento das plantas e de sistemas de defesa contra patógenos (TARIQ et al., 2020).

Além das RPCP, destaca-se o fungo pertencente ao gênero *Trichoderma*, tanto para o controle de patógenos radiculares ou habitantes do solo e substrato como promotores de crescimento vegetal (MASCARIN et al., 2019). Os fungos *Trichoderma* possuem cerca de 104 espécies, são cosmopolitas e podem ser isolados principalmente de materiais orgânicos em decomposição e do solo da rizosfera (ADNAN et al., 2019).

Apresenta potencial como agente de biocontrole de fungos patogênicos que atacam raízes de plantas e partes aéreas. Os principais mecanismos envolvidos nos efeitos de controle biológico de *Trichoderma* spp. são antibiose, parasitismo e competição, mecanismos que resultam da interação entre o fungo e o patógeno da planta. E também atua como indutor de resistência sistêmica em plantas por meio do mecanismo elicitor liberado pelo *Trichoderma* que leva a alterações nos níveis fisiológico, bioquímico e molecular da planta (ADNAN et al., 2019; ALFIKY; WEISSKOPF, 2021).

Algumas linhagens de *Trichoderma* ainda aumentam a superfície total do sistema radicular e podem melhorar os mecanismos ativos de solubilização e absorção de macro e micronutrientes, bem como, aumentar a eficiência da planta para utilizar alguns nutrientes importantes, como o nitrogênio (DAS et al., 2017; WOO; PEPE, 2018; MENDOZA-MENDOZA et al., 2018). De acordo, com Rubio et al., (2017) a colonização da raiz por *Trichoderma*, aumenta o desenvolvimento radicular, produtividade de grãos da cultura, resistência a estresses abióticos e melhora o uso de nutrientes.

Além disto, é notável o aumento do interesse por pesquisas que visam a necessidade da busca para melhorar a saúde e a produção das aleuro-oleaginosas, avaliando a eficiência da coinoculação de rizóbios e *Trichoderma* spp. (NIRMALKAR et al., 2017; YAHIA et al., 2018; MARRA et al., 2019; MENDES et al., 2020; CHAGAS JÚNIOR et al., 2021; ERAZO et al., 2021). Pesquisas que por vezes apresentam resultados contrastantes, indicando que a eficiência da coinoculação com rizóbios e *Trichoderma* varia em resposta a fatores agronômicos e ambientais, tais como métodos de coinoculação, espécies microbianas e atributos edáficos.

Todavia, são inúmeros os benefícios de microrganismos multifuncionais na agricultura, sendo cada vez mais incentivado o seu uso. Exemplo disso é o Programa Nacional de Bioinsumos instituído pelo Decreto N° 10.375, criado em 26 de maio de 2020 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), onde se destaca a preocupação que o País tem com a necessidade do setor produtivo agropecuário alinhar cada vez mais com

práticas inovadoras e sustentáveis, além de reduzir a dependência de insumos importados e ampliar a utilização da biodiversidade brasileira, e também estabelecer padrões para comercialização e uso destes microrganismos (BRASIL, 2020).

De acordo com dados disponíveis no aplicativo bioinsumos, do Programa de Bioinsumos do MAPA, há 555 produtos registrados como inoculantes até o momento e 526 produtos para o controle de pragas, destes 307 são inoculantes específicos para a cultura da soja. Assim sendo, é notável que o uso de bioinsumos é uma sólida ferramenta para a agricultura, fazendo parte do manejo integrado para a solução de problemas agrícolas, objetivando o equilíbrio entre o aumento de produtividade e a redução dos custos e os impactos ambientais, de modo que, as projeções apontam para um crescimento significativo para os próximos anos no uso de bioinsumos e de registro de produtos (MEYER et al., 2022).

Além disso, é importante ressaltar que para o MAPA, conforme Art.2º, Decreto 10.375, do Diário Oficial da União, bioinsumo é considerado: “um produto, processo ou tecnologia de origem [...] microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, [...], que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos” (BRASIL, 2020).

Diante do exposto, também se enquadra nesta categoria os “microrganismos eficazes” (*Effective Microorganisms - EM*), os quais são isolados naturalmente de solos férteis, e incluem bactérias produtoras de ácido lático, bactérias fotossintetizantes, leveduras, actinomicetos e fungos filamentosos. Esse mix de EM atuam na fermentação da matéria orgânica, produzindo ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e polissacarídeos, possibilitando um composto com teor elevado de nutrientes (BOTELHO, 2020).

Com os EM é possível a obtenção de um adubo orgânico que não agride o meio ambiente e constitui-se de uma ferramenta saudável tanto para o produtor quanto para o consumidor, denominado “Bio Bokashi”, advindo a partir de uma mistura vegetal fermentada com microrganismos eficazes (CARVALHO; RODRIGUES, 2007).

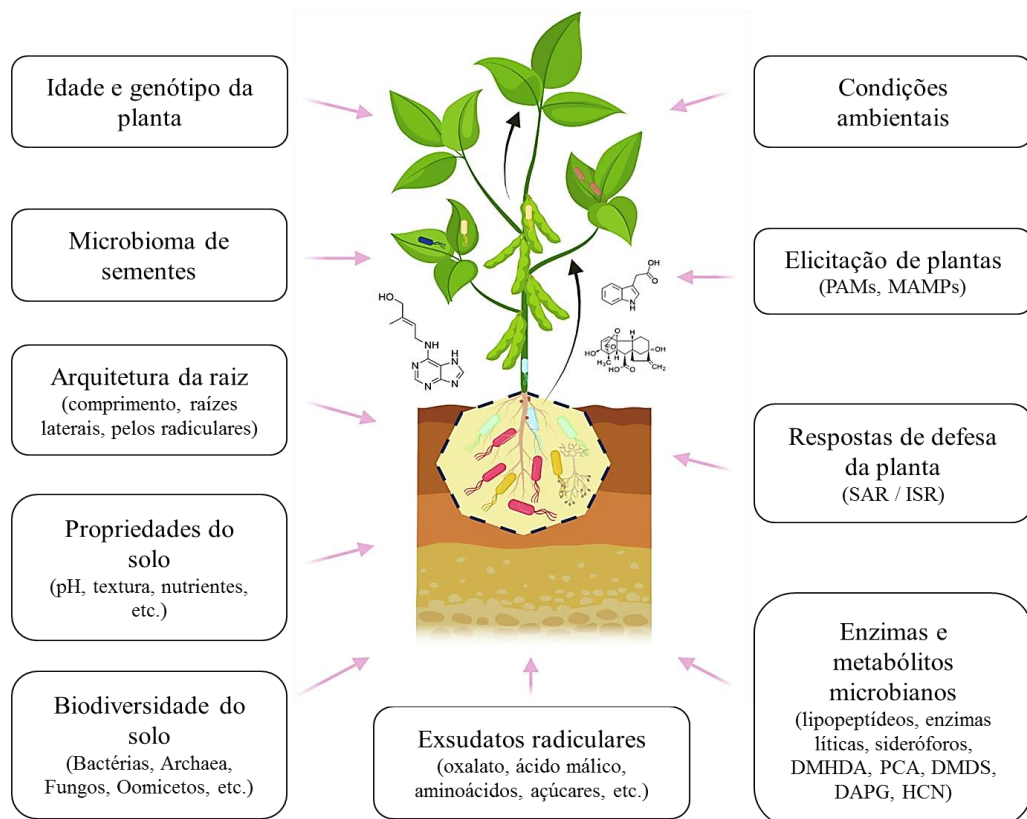
Esses compostos orgânicos fermentados tipo “bokashi” são obtidos com base em ingredientes que não contém resíduos tóxicos. Atualmente, não existe uma formulação padronizada para ele, apresentado diversas receitas empíricas, mais ou menos complexas e adaptadas a diferentes finalidades, confeccionados a partir de materiais com elevado teor de N, combinados com materiais de alto teor de carboidratos (OLIVEIRA et al., 2014)

De acordo com Medeiros et al. (2008), o uso do composto fermentado tipo “bokashi”

combinado a diversos resíduos orgânicos tem sido proposto para melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo, intervindo positivamente na produtividade das plantas e na qualidade dos produtos agrícolas obtidos.

Entretanto, ainda existem muitas lacunas nas interações entre microrganismos e suas conexões entre as plantas e na compreensão de como certas cepas estimulantes do microbioma vegetal benéfico podem atingir essa função (PARK et al., 2021). Portanto, há necessidade de mais pesquisas, que verifiquem os aspectos que regulam essas funções, incluindo importantes fatores abióticos como pH e tipo de solo, salinidade ou até mesmo o tipo de exsudatos radiculares (SANTOYO et al., 2017). De acordo, com a revisão de Santoyo (2022), são vários os fatores abióticos e bióticos que influenciam o recrutamento do microbioma vegetal nas três zonas de interação distintas: rizosfera, endosfera e filosfera, conforme pode ser observado na figura abaixo.

Figura 1. Vários fatores que modulam o recrutamento de um microbioma e as interações com a planta. Abreviaturas: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMs); Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs); Resistência Sistêmica Adquirida (SAR); Resistência Sistêmica Induzida (ISR); N,N-dimetil-1-hexadecilamina (DMHDA); ácido fenazina-1-carboxílico (PCA); Dissulfeto de dimetilo (DMDS); 2,4-diacetil floroglucinol (DAPG); Cianeto de hidrogênio (HCN).



Fonte: SANTOYO, G. (2022)

Portanto, embora os incentivos e os efeitos positivos da inoculação e coinoculação de RPCP tenham sido bem documentados, resultados inconsistentes em relação à promoção do crescimento de plantas em condições de campo são frequentemente observados (BREEDT et al., 2017; LIU et al., 2019). Além disso, após serem inoculadas, as cepas de RPCP precisam lidar com o desafio de mudanças no ambiente de vida e interações com comunidades microbianas locais (JACOBY et al., 2017). Dessa forma, é importante pesquisar continuamente as RPCP multifuncionais associadas a uma grande variedade de cepas, espécies de plantas e seus efeitos em campo sob condições ambientais e práticas agrícolas diversificadas (TIMMUSK et al., 2017).

4. FORMAS DE APLICAÇÃO DE BIOINSUMOS

Nesse cenário é visível a expansão do setor de biológicos na agricultura. Na cultura da soja a utilização dos bioinsumos é uma prática indispensável, sobretudo para a inoculação de *Bradyrhizobium* ou coinoculação, processo em que as bactérias fixadoras de nitrogênio, são colocadas em contato com as sementes ou solo antes da semeadura, sendo a utilização desta tecnologia fundamental para o fornecimento de N e para atingir altos tetos de produção no cultivo dessa leguminosa. Dessa forma, a busca por métodos de produção visando o aumento de produção e da qualidade do solo é cada vez mais constante e necessária, bem como a compreensão da sua capacidade de funcionar dentro dos limites do ecossistema e a interação com o ambiente externo (BÜNEMANN et al., 2018).

Logo, é importante selecionar um inoculante de acordo com as diferentes cepas que existem dentro de cada espécie, com as condições do agroecossistema, genótipo da cultura, práticas agrícolas, condições climáticas, benefícios e objetivos esperados (DÍAZ-RODRÍGUEZ et al., 2021). Visto que, a eficiência do inoculante depende da sobrevivência e estabelecimento do microrganismo inoculado na planta hospedeira e na rizosfera, que se baseia na competição microrganismo-planta-microbiota inoculada mediada pelos exsudatos vegetais (JIN et al., 2019).

Além disso, Msimbira e Smith (2020) ressaltam que para uma inoculação microbiana seja bem-sucedida depende de alguns fatores, tais como: método de inoculação, densidade de inóculo, colonização de raiz, que varia com a multiplicação e distribuição dos microrganismos através da rizosfera, antagonismo microbiano, estado fisiológico da planta, umidade e pH solo, temperatura, hospedeiro e exsudatos de raiz.

Dessa maneira, o sucesso dos inoculantes a base de bactérias e fungos no campo depende da forma de aplicação (sementes, solo, tecidos vegetais, rizosfera,). Essas formas

devem ser determinadas de acordo com o tipo da cultura, propriedades do solo, condições climáticas da região e com as práticas agrícolas (PATIL; SOLANKI, 2016; KAUSHIK; DJIWANTI, 2019).

A inoculação pode ser feita nas sementes, no sulco de semeadura, por pulverização na semeadura e por sementes pré-inoculadas (SEIXAS et al. 2020). Ademais, existem outras formas de inoculação e coinoculação, como a inoculação em pós-emergência via pulverização foliar, que geralmente é feita como uma forma complementar quando não se obtém boas quantidades de nódulos formados pela inoculação na semente ou no solo (ZILLI et al., 2008).

A forma mais comum de aplicação de inoculantes tradicionalmente é feita via sementes, também denominada como “padrão” por muitos autores, a qual consiste na aplicação dos rizóbios diretamente nas sementes, seja ele líquido ou turfoso, de acordo com a recomendação do produto-fabricante. Todavia, apesar de sua simplicidade e baixo custo, esse método nem sempre é eficiente, devido a desuniformidades no recobrimento do inoculante (bactéria) na semente (ZILLI et al., 2010), e principalmente pela aplicação conjunta do rizóbio com fungicidas, inseticidas e micronutrientes, que contribuem para causar toxidez às bactérias e danos às vezes irreversíveis às sementes (VARGAS; SUHET, 1980).

Além disso, Hungria e Nogueira, (2022) reafirmam, que os efeitos deletérios do contato de agrotóxicos e outros insumos químicos no tratamento de sementes sobre a sobrevivência de rizóbios são relatados há décadas (HUNGRIA et al., 2017; CAMPO et al., 2009; HUNGRIA; MENDES, 2015; HUNGRIA; NOGUEIRA, 2019) e o número de moléculas e formulações utilizadas para este fim cresce a cada ano. Diante disso, várias tentativas foram feitas para a compatibilização entre biológicos e os produtos químicos utilizados no tratamento de sementes, principalmente fungicidas e inseticidas, porém os resultados não são satisfatórios (HUNGRIA et al., 2007; CAMPO et al., 2009).

Ademais, apesar de diversos estudos realizados com uma gama de combinações de químicos utilizados no tratamento de sementes, ainda são desconhecidas as reais consequências destes sobre a sobrevivência do *Bradyrhizobium* e demais bactérias quando aplicados juntos nas sementes. Outra conciliação entre produtos químico-biológicos que pode ser ainda mais limitada é quando se usa sementes pré-inoculadas (inoculação antecipada), onde a exposição da bactéria aos químicos é por um período de tempo maior, podendo haver também, incompatibilidades com outros químicos, como os micronutrientes e suas diferentes formulações (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2022)

Segundo Pereira et al. (2022) o maior obstáculo para a eficácia da inoculação na soja é o uso de agroquímicos no tratamento das sementes, principalmente inseticidas e fungicidas, e

outros fatores como a proteção das sementes contra as altas temperaturas e a radiação solar incidente. Além disso, embora a técnica seja utilizada há décadas nas lavouras de soja do País, o procedimento de inoculação de sementes é frequentemente descrito como um ato que reduz a eficiência da semeadura devido ao tempo da operação. Pereira et al. (2016) citam que alguns produtores acabam por não realizar esta prática, por ser demorada e exigir equipamentos que às vezes não estão disponíveis aos produtores além de grande mão de obra.

Outro método que tem sido bem difundido e aceito é a aplicação do rizóbio, pulverizado no sulco de semeadura, na mesma operação de distribuição da semente no momento de instalação da lavoura de soja (ZHANG; SMITH, 1996). Considerando o fato de que os rizóbios de soja apresentam facilidade de se estabelecer no solo e sobreviver com substratos orgânicos (WILLIAMS, 1984), a aplicação no sulco de semeadura pode ser uma melhor alternativa, sendo indicada, sobretudo para condições adversas, como solos secos e quentes ou sementes tratadas com produtos deletérios para o rizóbio (RAMOS; RIBEIRO, 1993). Além de ser recomendada, quando necessário à aplicação de altas doses de inoculantes, para evitar o contato direto de fungicidas e micronutrientes com a semente, aumentando o número de células viáveis na semente, o que será fundamental para a (FBN) (JENSEN, 1987).

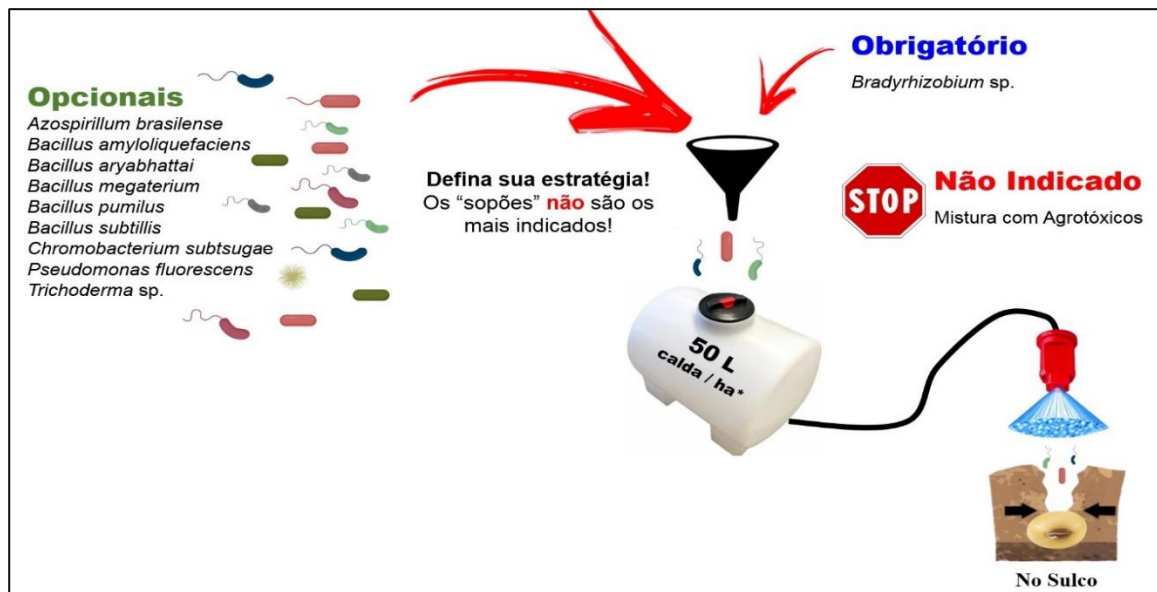
Esse método de pulverizar o inoculante diretamente nos sulcos de semeadura por meio de jato direcionado, conseqüentemente evita o contato direto da bactéria com os produtos utilizados no tratamento de sementes, porém demanda custos elevados, em virtude da maior quantidade de inoculante, por requerer mais água e adaptação da semeadora, tornando se por vezes, oneroso. Entretanto, a diluição do inoculante na água, para aplicação no sulco, melhora a distribuição do rizóbio na semente e no solo, afastando-o da superfície e posicionando-o em uma área com menor variação de temperatura e umidade, ficando, portanto, melhor localizado para infectar as raízes da soja (GREENFIELD, 1991; VOSS, 2002; ZILLI et al., 2010).

Segundo Martin et al. (2021) entre as formas de inoculação, a via pulverização no sulco de semeadura é a mais assertiva. Principalmente para o processo de coinoculação e de misturas de microrganismos na mesma calda, formando um “sopão microbiológico”, porém ressalta que ainda não são totalmente conhecidas as interações entre as junções de vários microrganismos, o que pode acarretar perda de eficiência.

Outro ponto destacado por Martin et al. (2021), é em relação ao volume de inoculante, o qual deve ser maior e respeitar as inter-relações entre os microrganismos. Como por exemplo, no processo de coinoculação deve-se utilizar a relação 3:1, ou seja, três vezes a dose de *Bradyrhizobium* para uma dose de *Azospirillum*, devido a inúmeros fatores, como as

diferenças nas taxas de velocidade de crescimento e de colonização. Na Figura 2, ilustra-se alguns microrganismos que podem entrar na composição da calda de pulverização, assim como a utilização obrigatória do *Bradyrhizobium* spp.

Figura 2. Microrganismos de uso opcional, obrigatório e não indicado na pulverização em sulco de semeadura.



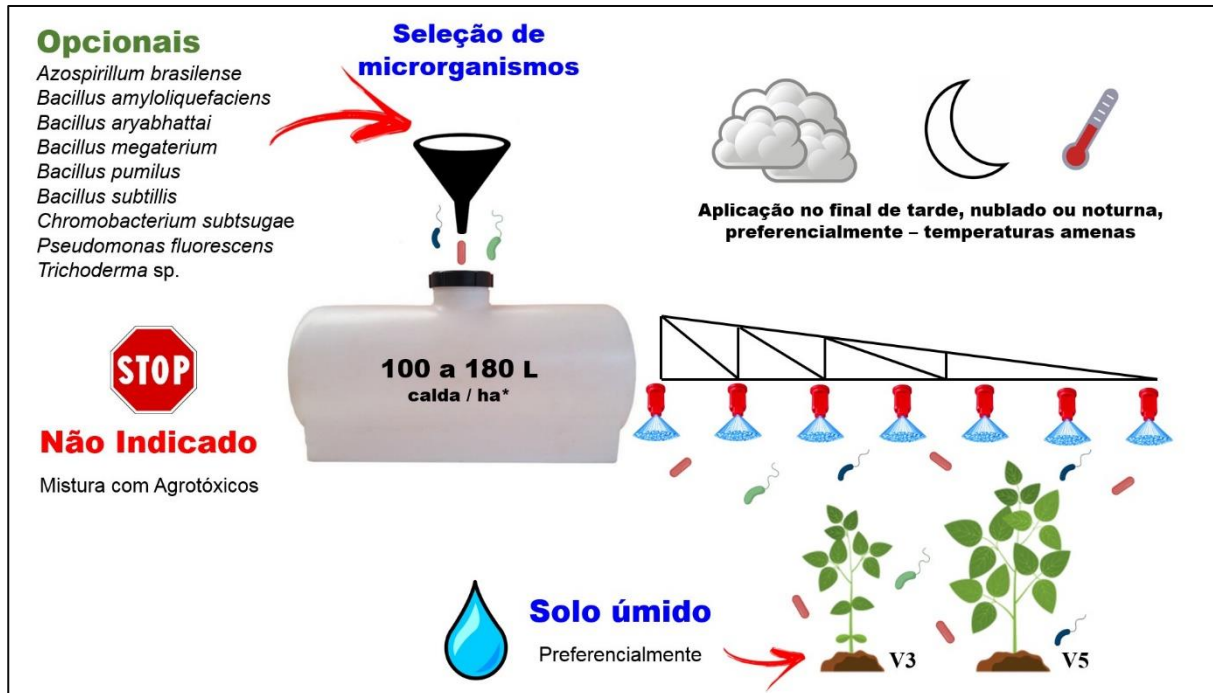
Fonte: MARTIN et al. (2021)

Em relação à concentração estimada de microrganismos necessária para haver efeitos positivos nas plantas, à recomendação atual, é que se tenha no mínimo 1,2 milhões de células viáveis a serem inoculadas por semente (HUNGRIA et al., 2017), ou 2,5 milhões de células/sememente via sulco de semeadura (CAMPO et al., 2010), que só podem ser garantidos por inoculantes de qualidade, com alta concentração de células e isentos de contaminantes (HUNGRIA; CAMPO, 2007). Segundo Zayed (2016), não pode ser estabelecido um padrão geral, porque varia de acordo com a espécie do microrganismo; no entanto, alguns inoculantes microbianos contêm de 10^7 a 10^9 UFC/g de bioproduto, fator este favorecido por falta de normas internacionais.

De modo geral, os inoculantes são comumente aplicados via tratamento de sementes ou no sulco. Mas, outros métodos como a pré-inoculação de sementes e a inoculação por pulverização do solo ou foliar após a semeadura também são utilizados, contudo estes métodos devem ser alternativos, devendo ser adotados somente em caso de emergência, de forma complementar. Por exemplo, em caso de falha da nodulação, não substituindo a aplicação via sementes ou sulco de semeadura; sendo que nesse caso, a aplicação deve ser

feita com alto volume de calda, em solo úmido, no final da tarde, conforme a figura abaixo (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2022; MARTIN et al., 2021).

Figura 3. Microrganismos de uso opcional na pulverização aérea no estágio vegetativo da soja.



Fonte: MARTIN et al. (2021)

Nesse contexto, a pré-inoculação de sementes de soja, permite que o agricultor se dedique à operação de semeadura, sem a necessidade de lidar com a inoculação diária, que costuma ser demorada e demanda mão-de-obra. Porém, em geral, o número de células sobreviventes na época da semeadura é muito aquém do mínimo desejado para proporcionar uma nodulação precoce e efetiva, podendo prejudicar a nodulação em áreas submetidas a estresses abióticos, principalmente a seca (SARTORI et al. 2023).

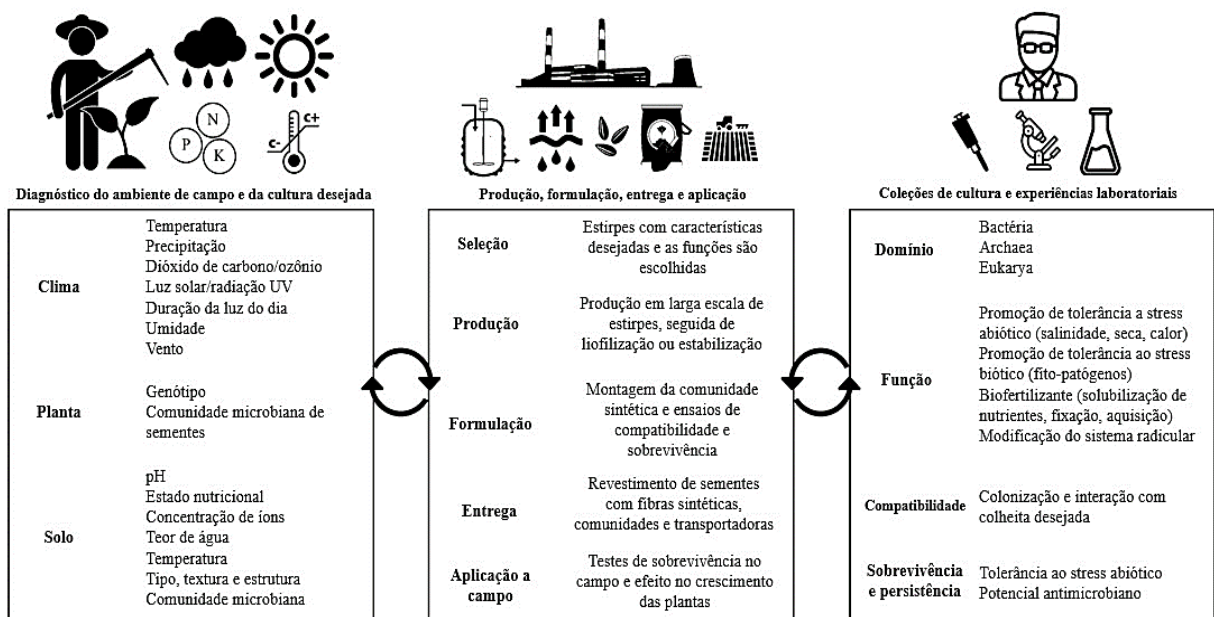
Segundo Santos et al., (2021) quando se realiza a pré-inoculação de sementes, aplicando inoculantes muitos dias ou algumas semanas antes da data de semeadura devido à logística e praticidade, aumenta o efeito negativo na sobrevivência da bactéria, visto que esta é uma prática que prolonga substancialmente o tempo de exposição do rizóbio a fatores externos e ao tratamento químico das sementes, corroborando com estudos de Hungria et al. (2020).

Portanto, a forma de inoculação ou coinoculação de microrganismos na agricultura e na cultura da soja, a depender, possibilita um melhor desempenho da FBN e dos demais

microrganismos multifuncionais, permitindo maiores incrementos e ganhos em produtividade. Entretanto, está é apenas uma estratégia. E nenhuma estratégia é capaz de obter êxito de forma isolada, sendo assim, é necessário um conjunto de estratégias para o sucesso dos microrganismos no campo.

Diante disso, SAAD et al., (2020) elaboraram um roteiro para aplicações bem-sucedidas de inoculantes microbianos associados a plantas (Figura 4). Neste roteiro, é proposto um modelo de estrutura a ser seguida por agricultores, comunidade científica e por empresas de tecnologia agrícola, para um trabalho coletivo, afim de realizar aplicações com êxito e superar as muitas limitações e desafios existentes na aplicação de inoculantes microbianos em ambientes agrícolas reais e de grande escala.

Figura 4. Estrutura proposta para a aplicação bem sucedida de inoculantes microbianos na agricultura. Uma estrutura na qual os agricultores/indústria agrícola, a comunidade científica e as empresas de pesquisa e tecnologia agrícola contribuem coletivamente para alcançar o objetivo de aplicações bem-sucedidas de inoculantes microbianos. Os inoculantes microbianos devem ser personalizados para a cultura alvo, clima e propriedades do solo (painel esquerdo). Um aumento na investigação científica de microbiomas vegetais, coleções de culturas e caracterização funcional de potenciais inoculantes microbianos abre caminho para satisfazer as necessidades dos agricultores (painel direito). A integração dos inoculantes microbianos disponíveis com as necessidades dos agricultores e a produção e formulação em larga escala é realizada por empresas de tecnologia agrícola (painel central).



Fonte: SAAD et al., (2020)

Nesta estrutura, Saad et al., (2020) destaca três aspectos: 1º - a necessidade da análise detalhada do ambiente do campo alvo e da cultura de interesse. 2º - amplo contexto geográfico, com aumento na pesquisa científica sobre microbiomas vegetais e experiências em laboratório, bem como mais isolamentos dependentes da cultura, formação de coleções de culturas sistemáticas que cubram uma ampla gama de domínios microbianos. No 3º aspecto, pontua a integração dos dados de campo dos agricultores e dos recursos microbianos disponíveis da pesquisa científica realizada por empresas de tecnologia agrícola, a fim de personalizar um inoculante adequado para a finalidade prescrita.

Por conseguinte, é preciso cada vez mais investigar o microbioma vegetal, as diversas interações entre planta associada a uma infinidade de microrganismos que fornecem à planta uma gama de funções essenciais para se adaptar ao ambiente local, desenvolver e produzir. Conhecer de forma minuciosa o solo, o ambiente e as técnicas ou formas de melhor posicionar e aplicar microrganismos multifuncionais no campo. Principalmente, para que eles possam se adaptar e/ou sobreviver no ambiente alvo e na planta cultivada, obtendo o sucesso almejado.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, M. et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 7–18, 2019.
- AGOSTINETTO, D. et al., Manejo de plantas daninhas em soja cultivada em terras baixas do Rio Grande do Sul, *In*: MARTIN, T. N. et al., **Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja**. Santa Maria: Editora GR, 2022, v. 1, p. 405-421.
- ALFIKY, A.; WEISSKOPF, L. Deciphering *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 61, 2021.
- AMARANTE, L.; SODEK, L. Efeito do alagamento na glutamina da seiva do xilema da soja nodulada. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 405-410, 2006.
- ARAÚJO, A. S. F. et al. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 182–185, 2010.
- BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911–922, 1997.
- BARAL, B.; SILVA, J. A. T.; GUPTA, V. Xylem-mediated channeling of nitrogen in broad bean (*Vicia faba*). **Environmental and Experimental Biology**, v. 12, p. 187–197, 2014.
- BARAL, B.; SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-PREFEITA, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 97–109, 2016.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, 2009.
- BOHLOOL, B. B. et al. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, v. 141, n. 1-2, p. 1–11, 1992.
- BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.
- BOLAN, N. S. et al. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, n. 2, p. 169–174, 1997.
- BORRIS, R. *Bacillus*, plant beneficial bacterium. In: LUGTENBERG, B. (Ed.) **Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture**. Berlin: Springer, 2015. p. 379–391.
- BOTELHO, A. B. R. Z. “**Bio Bokashi**”: O que é e para que serve? SoluBio Tecnologias Agrícolas LTDA. 2020. Disponível em: <http://www.solubio.agr.br/post/bio-bokashi-o-que-%C3%A9-e-para-que-serve>. Acesso: agosto de 2023.
- BRAGA JUNIOR, G. M. et al. Efficiency of inoculation by *Bacillus subtilis* on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of**

Agricultural Sciences, v. 13, n. 4, p. 1–6, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Bioinsumos – Programa Nacional de Bioinsumos**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/national-bioinputs-program>. Acesso em: março de 2023.

BREEDT, G.; LABUSCHAGNE, N.; COUTINHO, T. A. Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. **Annals of Applied Biology**, v. 171, n. 2, p. 229–236, 2017.

BÜNEMANN, E. K. et al. Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, n. 120, p. 105–125, 2018.

CÂMARA, G. M. S. **Fixação biológica de nitrogênio suporta altas produtividades de soja?** Revista Campo & Negócios, 2018. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/fixacao-biologica-de-nitrogenio-suporta-altas-produtividades-de-soja>. Acesso: agosto 2023.

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agrônomicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 154–163, 2009.

CARLOS, F. S. et al. Soybean crop incorporation in irrigated rice cultivation improves nitrogen availability, soil microbial diversity and activity, and growth of ryegrass. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104313, 2022.

CARVALHO, J. O. M.; RODRIGUES, C. D. S. **Bokashi**. Embrapa, Porto Velho, RO, 2007.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

CEREZINI, P. et al. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160–167, 2016.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Soybean productivity with *Trichoderma asperellum* seed treatment in different regions of the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 4, p. 1–8, 2021.

CHIHAOUI, S. A. et al. Inoculation of *Phaseolus vulgaris* with the nodule-endophyte *Agrobacterium* sp. 10C2 affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities and enhances nodulation and growth. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 805-813, 2015.

COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 169–175, 2003.

COELHO, L. L. et al. Seeding furrow opening mechanisms and the soybean planting in lowland areas. **Ciência Rural**, v. 50, p.1-10, 2020.

COELHO, L. L. **Manejo do solo para cultivo de soja em terras baixas**. Tese de Doutorado em Agronomia no Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Federal de

Santa Maria. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/25966>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da produção da safra brasileira: grãos safra 2019/2020**, Brasília, DF, sétima pesquisa, 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos safra 2022/23**, Brasília, DF, v. 10, n. 6º levantamento, março 2023.

CONCENÇO, G. et al. Caracterização fitossociológica de plantas daninhas em função de herbicidas residuais aplicados ao arroz cultivado sob irrigação por aspersão. **Agricultura Experimental**, v. 54, p. 01-12, 2017.

DAS, T. et al. In vitro compatibility study between the Rhizobium and native Trichoderma isolates from lentil rhizospheric soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 8, p. 1757-1769, 2017.

DEAK, E. A. et al. Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1327, 2019.

DELAMUTA, J. R. M. et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3342-3351, 2013.

DENARDIN, L.G.O. et al. No-tillage increases irrigated rice yield through soil quality improvement along time. **Soil and Tillage Research**, v. 186, p. 64–69, 2019.

DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host development pathways. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 4, p. 348-358, 2011.

DÍAZ-RODRÍGUEZ, A. M. et al. The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. 614739, 2021.

DÖBEREINER, J. et al. Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants. *In*: HEGAZI, N.A. et al., eds. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: The American University, 1994, p.395-408.

DRIGO, B. et al. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 24, p. 10938–10942, 2010.

DURAN, V. A; TODD, C. D. Four allantoinase genes are expressed in nitrogen-fixing soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 149-155, 2012.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina, Embrapa Soja, 2020, p. 280.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer, 2005, p. 380.

ERAZO, J. G. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386. **Biological Control**, v. 164, p. 104774, 2021.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FAGAN, E. B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - revisão. **Revista FZVA**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FEITOZA, A. **Microrganismos probióticos para o solo e as plantas**. LinkedIn. 2023. Disponível em: https://www.linkedin.com/posts/adailson-feitoza-81668549_agricultura-sustentabilidade-biotecnologia-activity-7036375379888025600-mKuu?utm_source=share&utm_medium=member_android. Acesso em: 14 março 2023.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v. 79, p. 139-152, 2002.

FGV - FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. **Comércio Internacional e o Agronegócio Brasileiro: sumário executivo**. Rio de Janeiro. P. 20. 2015. Disponível em: https://bibliotecadigital.fgv.br/dspace/bitstream/handle/10438/17858/Com%C3%A9rcio_Internacional_e_o_Agroneg%C3%B3cio_Brasileiro_Sum%C3%A1rio_Executivo.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 14 março 2023.

FINOTO, E. L., et al. Desenvolvimento e produção de soja co-inoculada com *Azospirillum brasilense* em semeadura direta sobre palhicho de cana crua. **Revista Nucleus**, Edição Especial, p. 9-14. 2017.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 2018.

FLAUZINO, D. S. et al. Soja associada a inoculação e co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* após cultivos de outono-inverno. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.5, n.1, p.47-53, 2018.

FLECK, A. G. et al. Soil deep tillage performed before soybean cultivation on the rice cultivation in the following harvest. **Ciência Rural**, v. 53, p. e20210621, 2022.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

GAGNÉ-BOURQUE, F. et al. Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *brachypodium distachyon* colonized by *bacillus subtilis* b26. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130456, 2015.

GARCIA, N. et al. Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through different physiological and biochemical mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 172, p. 103975, 2020.

GIACOMELI, R. et al. Improving irrigation, crop, and soil management for sustainable soybean production in Southern Brazilian lowlands. **Scientia Agricola**, v. 79, p. 1-12, 2022.

- GREENFIELD, P. L. The influence of method of inoculation and certain herbicides on nodulation and seed yield of soybeans. **Sul Africano Journal of Plant and Soil**, v. 8, n. 3, p. 119-123, 1991.
- GUBIANI, P. I. et al. Transpiration reduction factor and soybean yield in low land soil with ridge and chiseling. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 42, p. 1-14, 2018.
- HINSINGER, P.; MARSCHNER, P. Rhizosphere: perspectives and challenges; a tribute to Lorenz Hiltner. **Plant and Soil**, v. 283, p. vii-viii, 2006.
- HODGE, A. et al. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 153–187, 2009.
- HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. *In*: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.
- 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. et al. Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy Journal**, p. 1-15, 2020.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. *In*: IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. et al. (Ed.). **Biofertilizantes en Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial**. Montevideo: Cyted/Biofag, 2007. p. 22-31.
- 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**. (Embrapa Soja. Documentos, 283). Londrina: Embrapa Soja, 2007, p. 80.
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? *In*: De Bruijn, F.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**, New Jersey, New York: John Wiley & Sons, Inc. 2015. p. 1009-1023.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica de nitrogênio. *In*: SEIXAS, C. D. S. et al. (ed.). **Tecnologias de produção de soja**. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17). Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica do nitrogênio. *In*: MEYER, M.C.; BUENO, A.F.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. (Org.). **Bioinsumos na cultura da soja**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2022, v. 1, p. 143-162.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Mitos, verdades e desafios. **Boletim de Pesquisa n. 19 2019/2020**. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62.

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

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. 06, n. 06, p. 811–817, 2015.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 819–830, 1997.

HUNGRIA, M; MENDES, I. C.; MARTINS, F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja**. Embrapa Soja, p. 24. 2013.

ILANGUMARAN G.; SMITH D.L. Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. **Frontiers in Plant Science**, v.8, e1768, 2017.

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Área e produção de arroz**. Porto Alegre: IRGA, 2021. 3 p. Disponível em: <https://admin.irga.rs.gov.br/upload/arquivos/202108/03112722-producao-rs-historico.pdf>. Acesso em: 14 março 2023.

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Área semeada na safra 2022/2023 é de 839 mil hectares no RS**. 2023. Disponível em: [https://irga.rs.gov.br/area-semeada-na-safra-2022-2023-e-de-839-mil-hectares-no-rs#:~:text=A%20C3%A1rea%20total%20semeada%20com,total%20\(455%20mil%20ha\)](https://irga.rs.gov.br/area-semeada-na-safra-2022-2023-e-de-839-mil-hectares-no-rs#:~:text=A%20C3%A1rea%20total%20semeada%20com,total%20(455%20mil%20ha)). Acesso em: 14 março 2023.

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Boletim de resultados da safra 2021/22 em terras baixas: arroz irrigado e soja**. 2022. Disponível em: <https://irga.rs.gov.br/upload/arquivos/202209/26133439-relatorio-irga-safra-2021-22.pdf>. Acesso: 25 março 2023.

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Boletim de resultados da safra 2022/23 em terras baixas: arroz irrigado e, soja e milho em rotação**. 2023. Disponível em: <https://admin.irga.rs.gov.br/upload/arquivos/202308/23105302-boletim-de-resultados.pdf>. Acesso em: 30 agosto 2023.

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Intenção de Semeadura - Safra 2022/2023**. 2023. Disponível em: <https://admin.irga.rs.gov.br/upload/arquivos/202209/27145215-safra-2022-23-intencao.pdf>. Acesso em: 05 fevereiro 2023.

JACOBY, R. et al. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

JAVAUX, E. J. Extreme life on Earth—past, present and possibly beyond. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 37–48, 2006.

JENSEN, E.S. Inoculation of pea by application of *Rhizobium* in the planting furrow. **Plant**

and Soil, v. 97, p. 63-70, 1987.

JIN, Y. et al. Role of Maize Root Exudates in Promotion of Colonization of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 in Rhizosphere Soil and Root Tissue. **Current Microbiology**. v. 76, p. 855-862, 2019.

KALIA, A.; GUPTA, R. P. Conservação e utilização da diversidade microbiana. **NBA Ciência**. v. 1, p. 1–40. 2005.

KANG, S.; MILLS, A. L. Soil bacterial community structure changes following disturbance of the overlying plant community. **Soil Science**, v. 169, n. 1, p. 55–65, 2004.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Acid Tolerant Microbial Inoculants: A Requisite for Successful Crop Production in Acidic Soils. *In*: ARORA, N., KUMAR, N. (eds) Phyto e Rhizo Remediation. **Microorganisms for Sustainability**, Springer, Singapura, 2019, v. 9, p. 235–247.

KAUSHIK, S.; DJIWANTI, S. R. Nanofertilizantes: entrega inteligente de nutrientes para plantas. *In*: PANPATTE D. G.; JHALA Y. K. (eds) **Nanotecnologia para Agricultura: Produção e Proteção de Culturas**, Cingapura: Springer, 2019, p. 59–72.

KIJNE, J. W. The Rhizobium infection processo. *In*: STACEY, G. et al, (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman; Hall, 1992. p.349-398.

KRINGS, T. N. et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, p 648 – 657, 2007.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Bacillus as PGPR in crop ecosystem. *In*: **Bacteria in agrobiology: crop ecosystems**. Berlin: Springer, 2011, p. 37-59.

LAHLALI, R. et al. Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. **Biocontrol Science Technology**, v. 21, p. 1351-1362, 2011.

LAZCANO, A.; PERETÓ, J. On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory. **Journal of Theoretical Biology**, v. 434, p. 80–87, 2017.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, v. 629, p. 255-266, 1993.

LEMANCEAU P. et al. Plant Communication With Associated Microbiota in the Spermosphere, **Rhizosphere and Phyllosphere**. v. 82, 2017.

LIU F. et al. Soil indigenous microbiome and plant genotypes cooperatively modify soybean rhizosphere microbiome assembly. **BMC Microbiology**. v. 19, p. 1–19, 2019.

LIU, C.-W.; MURRAY, J. The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. **Plants**, v. 5, n. 3, p. 33, 2016.

MADHU, M.; HATFIELD, J.L. Interação do enriquecimento com dióxido de carbono e umidade do solo na fotossíntese, transpiração e eficiência do uso da água pela soja. **Ciências**

Agrárias, v. 5, p. 410-429, 2014.

MANTOVANI, G. C.; VALENTE, A. M.; BASTOS, R. C. Exploratory analysis of soybean production and exports and fertilizer imports by Brazil. **Concilium**, v. 23, p. 235–248. 2023.

MARCHESAN, E. Desenvolvimento de tecnologias para cultivo de soja em terras baixas. **Revista Eletrônica Competências Digitais Para Agricultura Familiar**, v. 2, p. 4-19, 2016.

MARCHESAN, E. Limitações e possibilidades de soja em áreas de arroz. *In*: MARTIN, T. N. et al., **Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja**. 1ed. Santa Maria: Editora GR, 2022, v. 1, p. 341-368.

MARRA, R. et al. Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1814–1822, 2019.

MARTIN, T. N. et al. Microrganismos promotores de crescimento, fixadores de nitrogênio e solubilizadores na cultura da soja. *In*: MARTIN, T. N et al., **Tecnologias Aplicadas para o manejo rentável e eficiente da cultura da soja**. 1 ed. Santa Maria: Editora GR, 2022, v. 1, p. 69-103.

MARTIN, T. N.; VEY, R. T.; BRONZATTO, E. S.; SPANEVELLO, J. F.; SANTOS, R. E.; ROSO, A. S. Manejo de bioinsumos na cultura da soja. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. XXI, p. 28-32, 2021.

MASCARIN, G. M. et al. Produção industrial de *Trichoderma*. *In*: MEYER, M. C. MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa. 2019.

MCNEAR JUNIOR, D. H. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything in between. **Nature Education Knowledge**, v. 4, p. 1-20, 2013.

MEDEIROS, A. F. A. et al. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Soil**, v. 279, p. 141-152, 2006.

MEDEIROS, D. C. et al. Qualidade de mudas de alface em função de substratos com e sem biofertilizante. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 186-189, 2008.

MENDES, J. B. S. et al. *Trichoderma* and bradyrhizobia act synergistically and enhance the growth rate, biomass and photosynthetic pigments of cowpea (*Vigna unguiculata*) grown in controlled conditions. **Symbiosis**, v. 80, n. 2, p. 133–143, 2020.

MENDOZA-MENDOZA, A. et al. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.

MERCEDES M. S. et al. *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 alters *Arabidopsis thaliana* root architecture through regulation of the auxin efflux transporters PIN2, PIN3, PIN7, and ABCB19. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 35, n. 3, p. 215-229, 2022.

MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Bioinsumos na cultura da Soja**. Embrapa Soja, 2022.

- MIURA, K. A. et al. **Discrimination and Delimitation of the Lowlands in the State of Rio Grande do Sul: First Approach.** Pelotas, RS, Embrapa, 2015.
- MSIMBIRA, L. A.; SMITH, D. L. The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. 106, 2020.
- MULDER, C. et al. How plant diversity and legumes affect nitrogen dynamics in experimental grassland communities. **Oecologia**, v. 133, n. 3, p. 412–421, 2002.
- NIRMALKAR, V. K. et al. Field Efficacy of *Trichoderma harzianum* and *Rhizobium* against Wilt Complex of Chickpea. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1421–1429, 2017.
- OLIVEIRA, E. A. G. et al. **Compostos orgânicos fermentados tipo “bokashi” obtidos com diferentes materiais de origem vegetal e diferentes formas de inoculação visando sua utilização no cultivo de hortaliças.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 28, 2014.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. *In*: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). **The Prokaryotes. Berlin and Heidelberg:** Springer-Verlag, 2013. p. 427-451.
- OSBORNE, S.; RIEDELL, W. Impact of low rates of nitrogen applied at planting on soybean nitrogen fixation. **Journal of Plant Nutrition.**, v. 34, p. 436-448, 2011.
- PAJARES, S., BOHANNAN, BJM, E SOUZA, V. Editorial: o papel das comunidades microbianas em ecossistemas tropicais. **Frente. Microbiol.** v. 7, p. 1805, 2016.
- PANDEY D. et al. Efeitos do preparo convencional e permutações de plantio direto sobre as atividades enzimáticas extracelulares do solo e biomassa microbiana sob cultivo de arroz. **Res. de Cultivo do Solo.** 2014.
- PARK, Y. S. et al. Understanding plant social networking system: Avoiding deleterious microbiota but calling beneficials. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 22, n. 3319, 2021.
- PASSAGLIA, L. M. P. *Bradyrhizobium elkanii* nod regulon: insights através da análise genômica. **Genética e Biologia Molecular**, v. 40, n. 3, p. 703-716, 2017.
- PATIL, H. J.; SOLANKI, M. K. “Inoculante microbiano: era moderna de fertilizantes e pesticidas”, *In*: SINGH, H. D.; PRABHA, R. (Eds) **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, (Nova Delhi: Springer), p. 319–343. 2016.
- PEIRETTI, P. et al. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Plant during Growth Cycle. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 153, 2019.
- PEREIRA, C. S. et al. Diferentes vias, formas e doses de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja. **Global Science and Technology**, v. 09, n. 01, p. 56-57, 2016.
- PEREIRA, C. S. et al.; Formas de aplicação de inoculante na cultura da soja. **Revista Tecnológica**, v. 26, n. 2, p. 147-151, 2022.

- PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PINTO, L. F. S.; LAUS NETO, J. A. L.; PAULETTO, E. A. Solos de várzeas do Sul do Brasil cultivados com arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de. (ed.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 75-95.
- PLOCHUK, R.A.; MIRALLES, D. J.; STRIKER, G. G. Uma revisão quantitativa das respostas da soja ao encharcamento: características agronômicas, morfofisiológicas e anatômicas de tolerância. **Plant Soil**. v. 475, p. 237–252. 2022.
- POMMORSKY, F. F. **Desenvolvimento de pacote biotecnológico para tratamento de sementes de soja**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. 97 p. 2016.
- PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of sub-merged soils. **Advances in Agronomy**. v. 24, p. 29-96, 1972.
- QUEVEDO, M. G.; CANEVER, M. D.; JANSEN, A. C.; SELAU, F. Ganhos comerciais na rotação das culturas de arroz e soja no Rio Grande Do Sul. In: **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 24, p. e1819, 2022.
- RAMOS, M. L. G.; RIBEIRO, W. Q. Effect of fungicides on survival of Rhizobium on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Soil**, v. 152, p. 145-150, 1993.
- REGO, C. H. Q. et al. Co-inoculation with Bradyrhizobium and Azospirillum Increases Yield and Quality of Soybean Seeds. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 6, p. 2302-2309, 2018.
- REIS, F. B. et al. Fixação de organismos biológicos uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Eds.) **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrado. 2011, p. 247-281.
- ROLIM, L. et al. Identification of soybean Bradyrhizobium strains used in commercial inoculants in Brazil by MALDI-TOF mass spectrometry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 905-914, 2019.
- RONDINA, A.B.L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with A. brasilense exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 537–549, 2020.
- RUBIO, M. B. et al. The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 294, 2017.
- SAAD, M. M.; EIDA, A. A.; HIRT, H. Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 13, p. 3878–3901, 2020.
- SANSINENEA, E. Applications and patents of Bacillus spp. in Agriculture. In: SINGH, H.; KESWANI, C.; SINGH, S. (Eds). **Intellectual property issues in microbiology**. Singapore:

Springer, 2019.

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, p. 870, 2021.

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

SANTOYO, G. et al. Métodos para detectar características de biocontrole e promoção do crescimento de plantas em rizobactérias. *IN*: REINHARDT, D.; SHARMA, A. K. (Eds) **Biology Research**, Cingapura: Springer, 2019, p. 133–149.

SANTOYO, G. et al. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. e03R01, 2017.

SANTOYO, G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **Journal of Advanced Research**, v. 40, p. 45-58, 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, 2023.

SARTORI, G. M. S. et al. Soil tillage systems and seeding on grain yield of soybean in lowland area. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 492-498, 2016.

SAXENA, A. K. et al. Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 2020.

SCIVITTARO, W. B.; VASCONCELOS, E. E.; GRIEP, S. P.; AZEVEDO, V. J.; SOUSA, R. O. de. **Emissões de Gases de Efeito Estufa da Rotação de Soja e Arroz Irrigado em Terras Baixas do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2022, p. 19.

SEIXAS, C. D. S. et al. **Tecnologias de Produção de Soja**. Londrina, (Sistemas de Produção /Embrapa Soja), n. 17, p. 347, 2020.

SHAH, V.; SUBRAMANIAM, S. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: A representative model organism for studying the impact of pollutants on soil microbiota. **Science of The Total Environment**, v. 624, n. 963-967, 2018.

SHAHID, I., MALIK, KA & MEHNAZ, S. Uma década de compreensão do metabolismo secundário em *Pseudomonas* spp. para agricultura sustentável e aplicações farmacêuticas. **Sustentabilidade Ambiental**, v. 1, p. 3–17, 2018.

SHARMA, S. B., SAYYED, R. Z., TRIVEDI M. H.; GOBI T. A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2. p. 1-14, 2013.

SHARMA, V. et al. Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and

'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plants**, v. 9, n. 2, p. 276, 2020.

SHI, C. L. et al. Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166 is through both auxin-dependent and -independent signaling pathways. **Molecules and Cells**, v. 29, p. 251-258, 2010.

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, p. 325–335, 2019.

SILVA, K. et al. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* pre-inoculation in association with chemical treatment of soybean seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 14, p. 726-732, 2018.

SILVA, P. R. F.; MARCHESAN, E.; ANGHINONI, I. **Milho no contexto da lavoura arrozeira: potencialidades, desafios e avanços**. Porto Alegre: IRGA, 2020. 12 p. (Instituto Rio Grandense do Arroz. Circular técnica, 006).

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Farroupilha, RS, 205 p., 2018.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, p. 425-448, 2007.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. London: **Chapman and Hall**, 2 ed., 1990, p. 256.

STECCA, J. D. L. et al. Inoculation of soybean seeds coated with osmoprotector in diferents soil pH's. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 41, 2019.

SUN, W. et al. Effects of inoculation with organic-phosphorus-mineralizing bacteria on soybean (*Glycine max*) growth and indigenous bacterial community diversity. **Canadian journal of microbiology**, v. 63, n. 5, p. 392-401, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 888.

TARIQ, M. et al. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section B - Soil & Plant Science, v. 70, n. 6, p. 507-524, 2020.

TERRA, A. B. C. et al. Physiological characterization of diazotrophic bacteria isolated from *Brachiaria brizantha* rhizosphere. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 658-666, 2019

TIAN G. et al. Little environmental adaptation and high stability of bacterial communities in rhizosphere rather than bulk soils in rice fields. **Appied Soil Ecology**, v. 169, n. 104183, 2022.

TIMMUSK, S. et al. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p. 1–10, 2017.

TOCHETO, G. H. G; BOIAGO, P. N. Formas de aplicação de *Rhizobium tropici* e

Azospirillum brasilense coinoculados na cultura do feijão. **Revista Cultivando o Saber**, v. 13, n. 2, p. 37-48, 2020.

UDVARDI, M. K.; DAY D. A. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 493-523, 1997.

UPSON J. L, et al. The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant–microbe interactions across multiple timescales. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 108-116, 2018.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Efeitos da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 4, p. 17-21, 1980.

VIERA NETO, S. A. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 861-870, 2008.

VOSS, M. **Inoculação de rizóbio no sulco de semeadura para soja, em um campo nativo, no norte do Rio Grande do Sul**. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2002. p. 5.

WANG, M. et al. Efeitos da compactação do solo no crescimento vegetal, absorção de nutrientes e respiração radicular em mudas de soja. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 22835-22845, 2019.

WEI, M. et al. Extratos de sementes de soja expressam preferencialmente loci genômicos de *Bradyrhizobium japonicum* na interação inicial com a soja, *Glycine max*. **Pesquisa de DNA**, v. 15, n. 4, 201-214, 2008.

WILLIAMS, P. M. Current use of legume inoculant technology. *In*: ALEXANDER, M. **Biological nitrogen fixation. Ecology, technology and physiology**. New York, Plenum Press, 1984. p. 173-200.

WOO, S. L.; PEPE, O. Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1801, 2018.

YAHIA, M. A. et al. Laboratory and Field Studies of *Trichoderma harzianum*, Bacterial Strains and Imazethapyr on *Orobanche crenata* Forsk Infesting *Vicia faba*. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 6, n. 6, 2018.

ZAPATA, F. et al. Time Course of Nitrogen Fixation in Field-Grown Soybean Using Nitrogen-15 Methodology 1. **Agronomy Journal**, v. 79, n. 1, p. 172–176, 1987.

ZAYED, M. S. “Avanços em tecnologias de desenvolvimento de formulações”, *In*: SINGH, D. H. SING; PRABHA, R. (Eds) **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, (Nova Deli: Springer), p. 219–237, 2016.

ZHANG, F.; SMITH, D. L. Inoculation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. **Plant Soil**, v. 179, p. 233-241, 1996.

ZHOU, Y. et al. Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst

nematode (*Heterodera glycines*) in soybean. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 568-576, 2021.

ZHOU, Y. et al. Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0182654, 2017.

ZILLI, J. E. et al. In-furrow inoculation with *Bradyrhizobium* alternatively to seed inoculation of soybean. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1875-1881, 2010.

ZILLI, J. E.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 541-544, 2008.

CAPÍTULO 1. INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIÓNAIS NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

Com o avanço do crescimento populacional e a demanda por novas tecnologias voltadas para atividades agrícolas sustentáveis, há a necessidade de recorrer a ferramentas estratégicas para aumento da produção agrícola. Dentre as alternativas, a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas e microrganismos eficazes vem sendo cada vez mais estudadas por estimular as plantas a fixação biológica de nitrogênio, a produzirem mais raízes por meio da produção de fitormônios e ainda, por aumentar a disponibilidade de nutrientes. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação de bactérias e fungo na cultura da soja. O experimento foi realizado em casa de vegetação na área experimental de várzea da UFSM, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez tratamentos: 1) Testemunha (sem inoculação); 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa CCT 4065 SEMIA 586); 3) *B. japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145); 4) *B. japonicum* + *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF 94/17); 5) *B. japonicum* + *Pseudomonas fluorescens* (Cepa CCT 0595 ATCC 13525); 6) *B. japonicum* + *Bacillus subtilis* (Cepa CCT 3131 ATCC 6051); 7) *B. japonicum* + *Bacillus pumilus* (Cepa CCT 2487 ATCC 14884); 8) *B. japonicum* + *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350); 9) *B. japonicum* + *Bacillus megaterium* (Cepa CBMAI 2222) e 10) *B. japonicum* + Bio bokashi. Aos 50 dias após a instalação do experimento, foram realizadas avaliações biométricas, fisiológicas e químicas nas plantas. Os resultados identificaram que a inoculação e coinoculação de microrganismos não interfere na parte aérea das plantas, mas, influencia positivamente o sistema radicular. A inoculação de *B. japonicum* apresenta incrementos médio de 60,8 % na massa seca das raízes (MSR), 60,7 % no número de nódulos (NN) e 66,6% no volume radicular (VR), quando comparada a plantas não inoculadas. As coinoculações com as demais bactérias também expressaram resultados significativos na MSR. Obteve destaque a coinoculação com Bio bokashi, com um incremento médio de 99,2 % em relação a testemunha e de 23,8 % em relação a inoculação simples com *B. japonicum*. Quanto aos parâmetros fisiológicos, não houve diferença estatística entre os tratamentos para condutância estomática, concentração intracelular de CO₂ e taxa de transpiração. Contudo, pode-se observar que a inoculação com *B. japonicum* e a coinoculação com *A. brasilense*, *T. asperelloides*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e Bio bokashi obtiveram maior taxa líquida de assimilação de carbono e eficiência do uso da água. Não houve resultados significativos nos teores de nitrogênio, fósforo e potássio no tecido foliar das plantas em função dos microrganismos. Conclui-se que a inoculação simples com *B. japonicum* na soja é eficiente, aumentando a massa seca das raízes, volume radicular, nodulação, taxa líquida de assimilação de carbono e eficiência do uso da água. As coinoculação de *B. japonicum* com as demais bactérias estimula um maior aporte de massa seca de raiz nas plantas, com destaque a bactéria *A. brasilense* a qual incrementou maior massa seca de raiz, número de nódulos e volume radicular quando comparada a inoculação simples, sendo está uma boa escolha para coinoculação. A aplicação de microrganismos não influencia na nutrição dos tecidos vegetais.

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento, *Bradyrhizobium*, fixação biológica de nitrogênio, *Glycine max*.

INOCULATION AND COINOCULATION OF MULTIFUNCTIONAL MICROORGANISMS IN SOYBEAN CROPS

ABSTRACT

With the advancement of population growth and the demand for new technologies aimed at sustainable agricultural activities, there is a need to resort to strategic tools to increase agricultural production. Among the alternatives, the use of plant growth-promoting bacteria and effective microorganisms has been increasingly studied as they stimulate plants to biological nitrogen fixation, produce more roots through the production of phytohormones and also increase the availability of nutrients. Thus, the objective was to evaluate the effects of inoculation and coinoculation of bacteria and fungi in soybean crops. The experiment was carried out in a greenhouse in the UFSM floodplain experimental area, using a completely randomized experimental design, with four replications and ten treatments: 1) Control (without inoculation); 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Strain CCT 4065 SEMIA 586); 3) *B. japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145); 4) *B. japonicum* + *Trichoderma asperelloides* (Strain MMBF 94/17); 5) *B. japonicum* + *Pseudomonas fluorescens* (Strain CCT 0595 ATCC 13525); 6) *B. japonicum* + *Bacillus subtilis* (Strain CCT 3131 ATCC 6051); 7) *B. japonicum* + *Bacillus pumilus* (CCT 2487 Strain ATCC 14884); 8) *B. japonicum* + *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350); 9) *B. japonicum* + *Bacillus megaterium* (CBMAI Strain 2222) and 10) *B. japonicum* + Bio bokashi. Fifty days after the installation of the experiment, biometric, physiological and chemical evaluations were carried out on the plants. The results identified that the inoculation and coinoculation of microorganisms does not interfere with the aerial part of the plants, but positively influences the root system. Inoculation of *B. japonicum* presents an average increase of 60.8% in root dry mass (MSR), 60.7% in the number of nodules (NN) and 66.6% in root volume (VR), when compared to plants not inoculated. Coinoculations with other bacteria also showed significant results in MSR. Coinoculation with Bio bokashi stood out, with an average increase of 99.2% compared to the control and 23.8% compared to simple inoculation with *B. japonicum*. Regarding physiological parameters, there was no statistical difference between treatments for stomatal conductance, intracellular CO₂ concentration and transpiration rate. However, it can be observed that inoculation with *B. japonicum* and coinoculation with *A. brasilense*, *T. asperelloides*, *B. pumilus*, *B. megaterium* and Bio bokashi obtained a higher net rate of carbon assimilation and water use efficiency. There were no significant results in the levels of nitrogen, phosphorus and potassium in the leaf tissue of plants due to microorganisms. It is concluded that simple inoculation with *B. japonicum* in soybeans is efficient, increasing root dry mass, root volume, nodulation, net carbon assimilation rate and water use efficiency. Coinoculation of *B. japonicum* with other bacteria stimulates a greater supply of root dry mass in plants, with emphasis on the bacterium *A. brasilense*, which increased root dry mass, number of nodules and root volume when compared to simple inoculation, this is a good choice for coinoculation. The application of microorganisms does not influence the nutrition of plant tissues.

Keywords: growth-promoting bacteria, *Bradyrhizobium*, biological nitrogen fixation, *Glycine max*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país modelo quando se trata do uso de microrganismos benéficos na agricultura, com diversas ferramentas com potencial comprovado para a utilização na cultura da soja (HUNGRIA et al., 2020). Atualmente, com o crescimento populacional e a demanda por novas tecnologias voltadas para atividades agrícolas sustentáveis, obtém-se na utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), por meio de inoculante na semeadura, uma proposta atual e estratégica para potencializar resultados (MEYER et al., 2022).

Estas BPCP vêm sendo cada vez mais difundidas e aplicadas na agricultura, em diversas formas de bioinsumos, como uma alternativa de manejo para obtenção de maiores produtividades de grãos, controle biológico e redução de custos. Algumas técnicas de utilização desses microrganismos já são bem conhecidas e aplicadas no campo, como por exemplo, o uso de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que realizam fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MARTIN et al., 2022). As quais suprem até 94% do N total necessário para o desenvolvimento da soja, garantindo ganhos econômicos pela não utilização de fertilizantes nitrogenados e alavancando o cultivo da soja em grande escala no Brasil (HUNGRIA et al., 2020).

São vários os microrganismos benéficos multifuncionais que constituem um recurso genético de grande potencial para o desenvolvimento sustentável de áreas agricultáveis. Agindo como agentes biológicos maximizando a absorção e disponibilidade de nutrientes, promovendo o crescimento vegetal, conferindo resistência a estresse abiótico e suprimindo doenças em diversas culturas (CHAPARRO et al., 2012; O'CALLAGHAN et al., 2022; CUMMINGS, 2009; VLEESSCHAUWER; HÖFTE, 2009).

Além do gênero *Bradyrhizobium*, há outros microrganismos utilizados na cultura da soja com capacidade de estimular o crescimento vegetal, produção de enzimas, fitohormônios, solubilização de minerais inorgânicos e potencial de supressão de fito-patógenos (SANTOS et al., 2021). Tais como os gêneros *Azospirillum* (promoção de crescimento de raízes), *Bacillus* (solubilização de nutrientes), *Pseudomonas* (promoção de crescimento), *Trichoderma* (controle de fito-patógenos), dentre outros (SAAD, et al., 2020; MEYER et al., 2022).

Os bioinsumos são, portanto, uma ferramenta para a mitigação de vários desafios de manejo, estresses bióticos, abióticos e de controle a campo no sistema de produção agrícola brasileiro (MEYER, 2022). De modo que, uma alternativa promissora a ser mais explorada no Brasil, é a mistura de inoculantes oficialmente recomendados para a soja com outras BPCP,

uma técnica denominada coinoculação (HUNGRIA et al., 2013).

Quando adotada essa metodologia de coinoculação de microrganismos, verifica-se o aumento da produtividade de grãos na soja e resultados melhores que cada estirpe isolada, contribuindo para aumento da nodulação e crescimento radicular, além de potencializar a ocorrência de efeitos sinérgico entre estes microrganismos, aumentando os benefícios da utilização (SCHWAAB; AGUIAR, 2019). Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos de microrganismos multifuncionais em plantas de soja por meio da inoculação com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e da coinoculação com bactérias e um fungo comumente utilizados na cultura da soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido entre novembro de 2021 a janeiro de 2022, em casa de vegetação (modelo Van der Hoeven[®]), em condições de temperatura e umidade relativa do ar controladas, localizada na área Didático Experimental de Várzea, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. A área experimental está localizada em Santa Maria - RS nas coordenadas geográficas 29°43'08"S e 53°43'25"W, com altitude média de 91 metros. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen é caracterizado como subtropical úmido (Cfa), sem estação seca definida.

A pesquisa foi avaliada até o estágio R2 (FEHR; CAVINESS, 1977), sendo analisada em duas etapas, em planta no vaso e avaliações em laboratório. Empregou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por dez tratamentos, com quatro repetições, totalizando quarenta unidades experimentais. Os tratamentos consistiram da inoculação na semente com *Bradyrhizobium japonicum* e da coinoculação desta bactéria em associação com outras bactérias, um fungo e de um tratamento testemunha (sem inoculação), conforme a tabela 1.

As bactérias utilizadas foram adquiridas pelo banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e multiplicadas no laboratório MULTIBAC da UFSM, sendo elas: *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa CCT 4065 SEMIA 586) com concentração de 2×10^8 UFC/mL, na dose de 300 mL para cada 40 kg de sementes, *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145), *Pseudomonas fluorescens* (Cepa CCT 0595 ATCC 13525), *Bacillus subtilis* (Cepa CCT 3131 ATCC 6051), *Bacillus pumilus* (Cepa CCT 2487 ATCC 14884), *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350), *Bacillus megaterium* (Cepa CBMAI 2222) ambas com concentração mínima de 2×10^8 UFC/mL, sendo recomendada a dose de 100 mL de cada microrganismo para cada 40 kg de sementes.

Foi utilizado também o fungo *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF 94/17), concentração de 1×10^{10} UFC/g com recomendação de 5 g/ha e o adubo orgânico Bio bokashi, composto por um mix de microrganismos eficazes na dose de 150 mL/ha.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados na inoculação e coinoculação no experimento.

Tratamentos	
1	Testemunha (sem inoculação)
2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>
4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Trichoderma asperelloides</i> ¹
5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>
6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Bacillus subtilis</i>
7	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Bacillus pumilus</i>
8	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Bacillus megaterium</i>
10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + Bio bokashi ²

¹ Inoculante concentrado turfoso utilizado por meio do produto Trichoderma FT10[®]. Composição: *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF94/17), sacarídeos e surfactante não iônico. Natureza física: sólido. ² Fertilizante orgânico composto líquido utilizado por meio do produto Bio bokashi. Características: Extratos vegetais, bacilos e bactérias, melão de cana-de-açúcar, palha de arroz, bambu moído, carbono orgânico e nitrogênio.

A parcela experimental foi constituída de duas plantas cultivadas em um vaso de polietileno, cilíndrico, com 20 cm de altura e 10 cm de raio, com volume de 8 L⁻¹, sendo utilizado como substrato 6 kg de solo, proveniente da camada de 0,0 - 0,2 m de um Planossolo Háplico Distrófico gleissólico (SANTOS et al., 2018), com as seguintes características químicas: pH (água): 4.8; P-Mehlich: 5.6 mg dm⁻³; K: 0.041 cmol_c dm⁻³; Ca⁺²: 2.6 cmol_c dm⁻³; Mg⁺²: 1.2 cmol_c dm⁻³ e Al⁺³: 0.9 cmol_c dm⁻³; H+Al: 9.7 cmol_c dm⁻³; saturação de alumínio: 18.5 %; saturação de bases: 28.4 %, matéria orgânica: 0.8 % e 19% de argila. O solo foi previamente peneirado para retirada de torrões e impurezas maiores.

A correção do solo foi realizada em cada vaso dias antes da semeadura. Seguiram-se as recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2016), sendo que, a correção da acidez do solo foi realizada com o objetivo da aplicação de calcário para elevar o pH do solo a 6,0. Para isso, foi utilizado calcário filler, com Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT) acima de 90%. A adubação foi constituída de 17,5 kg ha⁻¹ de N, 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 70 kg ha⁻¹ de K₂O, o equivalente a 350 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 05-20-20, totalizando 4,2 g vaso⁻¹, o adubo foi macerado e

incorporado em todo o solo do vaso.

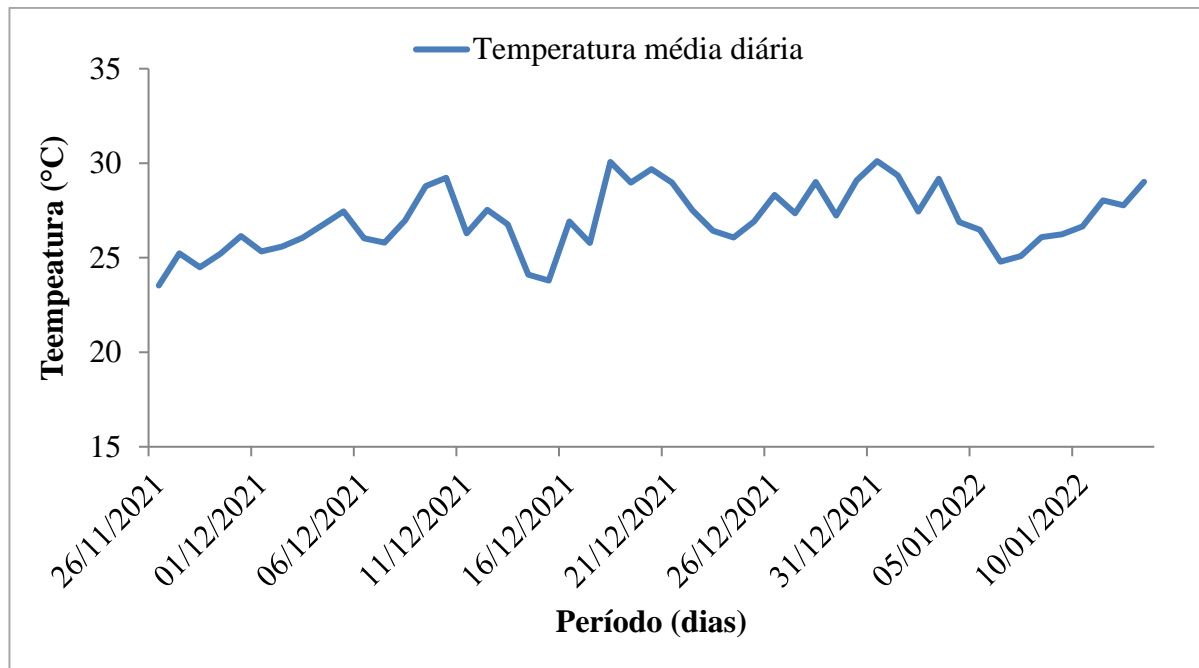
A semeadura foi realizada no dia 26/11/2021 com a cultivar CZ 15B70 IPRO, a qual apresenta grupo de maturação relativa: 5.7, tipo de crescimento indeterminado e 96% de germinação, sendo estas tratadas industrialmente com o produto Standak[®] Top, o qual possui como ingredientes ativos os fungicidas piraclostrobina e tiofanato metílico (25 g i. a. e 225 g i. a.) e como inseticida o fipronil (250 g i. a.) na dose de 500 mL 100 kg⁻¹, além de recobrimento das sementes com polímero Florite[®] 1197 Green (250 mL p. c. 100 kg⁻¹ de sementes) e o pó secante Sepiret[®] PF 16 White (200 g 100 kg⁻¹ de sementes).

O procedimento de inoculação e coinoculação das sementes foi realizado em laboratório 1 hora antes da semeadura. Realizou-se a pesagem de 1 kg de sementes para cada tratamento, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno identificados, procedendo-se em seguida à aplicação dos inoculantes conforme os tratamentos sobre as sementes, e homogeneização para a uniforme distribuição dos microrganismos nas sementes.

Realizou-se a semeadura acondicionando-se cinco sementes por vaso, na profundidade de 2 cm. Após a emergência e estabelecimento das plântulas foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso para completar o ciclo de desenvolvimento. A irrigação foi realizada diariamente, de forma manual com a utilização de um regador, objetivando o fornecendo de água para as plantas.

Durante todo o período experimental, as condições de temperatura da casa de vegetação foram monitoradas com o auxílio do equipamento Datalogger (Figura 1). Onde, seis sensores de temperatura do ar foram instalados dentro de parcelas experimentais, cujas informações foram registradas em intervalos de 1 hora. Os dados foram armazenados em um coletor de dados (datalogger marca Campbell Scientific, modelo CR 10X). Sendo possível observar registros de variações de temperatura mínima de 17 °C a até máximas superiores a 40 °C, durante a condução do ensaio.

Figura 1. Temperatura média diária (°C) para o período de desenvolvimento da soja cultivada em condições de casa de vegetação.



Aos 44 dias após a emergência (DAE), no estádio R1 entre as 10 e 12 h da manhã, no terço médio da folha do terceiro trifólio completamente expandido do ápice para a base da planta. Realizou-se as medições referentes às trocas gasosas das plantas, com utilização do medidor portátil Infra Red Gas Analyzer (IRGA), marca WALZ, modelo GFS-3000, utilizando uma radiação artificial fotossintética ativa de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Avaliando a taxa líquida de assimilação de carbono (A), a condutância estomática (Gs), a concentração interna de CO_2 (Ci), a taxa de transpiração (E) e a eficiência do uso da água (EUA), sendo esta última obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e quantidade de água transpirada.

Aos 50 DAE as plantas foram coletadas para avaliação (Figura 2). Foram mensuradas as seguintes variáveis: estatura da planta (cm), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSR, g), massa seca de nódulos (MSN, g), número de nódulos (NN), volume radicular (VR, cm^3), ambas as avaliações realizadas no período de florescimento pleno da cultura correspondente ao estádio R2.

Figura 2. Desenvolvimento das plantas do experimento em estádio R1 na casa de vegetação (A), avaliação fisiológica utilizando o medidor portátil Infra Red Gas Analyzer IRGA (B) e lavagem das raízes e nódulos para posterior avaliação (C).



A estatura das plantas foi determinada por meio de uma régua milimetrada pela distância compreendida entre a superfície do solo e o ápice da haste principal da planta (MARCHIORI et al., 1999). Posteriormente as raízes foram lavadas em água corrente sobre uma peneira para remoção do solo aderido. Separou-se o sistema radicular da parte aérea das plantas e os nódulos destacados das raízes para contagem (BRANDELERO et al, 2009).

A MSPA, MSR e a MSN foram obtidas por meio da secagem em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas até obtenção de massa constante. Após a secagem, foram pesadas em balança com precisão de 0,001g (MALTY et al., 2006). O volume da raiz foi determinado por meio de medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, segundo metodologia descrita por Basso (1999).

Em seguida, foi realizado em laboratório as análises químicas dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja. Utilizou-se três folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, das duas plantas por unidade experimental no estágio fenológico R1. Posteriormente, as amostras foram submetidas à moagem em moinho do tipo Willey e processadas seguindo a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

A análise estatística dos resultados obtidos foi executada com auxílio do programa Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2019), sendo os dados submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa da inoculação e coinoculação de microrganismos benéficos nas sementes avaliados nos parâmetros biométricos da parte aérea das plantas (Tabela 2). No entanto, apesar da baixa resposta dos tratamentos na estatura da planta e massa seca da parte aérea (MSPA), foi possível identificar respostas no sistema radicular, onde a

massa seca das raízes (MSR), número de nódulos (NN) e volume radicular (VR) apresentaram diferenças significativas.

No sistema radicular das plantas, é possível notar a influência positiva da inoculação simples com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, com incrementos médio de 60,8 % na MSR, 60,7 % de NN e 66,6% no VR, em comparação com a testemunha sem nenhuma inoculação (Tabela 2), ressaltando o seu potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN), suprimindo a demanda de nitrogênio (N) na cultura através dos seus nódulos fixados nas raízes (MEDEIROS et al., 2020)

As coinoculações com as demais bactérias também expressaram resultados significativos na MSR, com exceção do fungo *Trichoderma asperelloides*. Obteve destaque a coinoculação com o adubo orgânico Bio bokashi, com um incremento médio de 99,2 % em relação a testemunha e de 23,8 % em relação a inoculação simples com *B. japonicum*. O Bio bokashi, vem sendo cada vez mais uma ferramenta utilizada no manejo sustentável do solo e em interações entre os microrganismos, sendo um aditivo orgânico preparado a partir de matéria orgânica fermentada com um inóculo microbiano, oriunda de um de uma fonte de matéria prima rica em N e em carbono de fácil assimilação microbiana, que resulta em uma fonte de microrganismos eficazes e benéficos as plantas (QUIROZ; CÉSPEDES, 2019).

Tabela 2. Estatura da planta, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN), volume radicular (VR) no estágio R2, em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.

Tratamentos	Estatura	MSPA	MSR	MSN	NN	VR
	cm planta ⁻¹	-----g planta ⁻¹ -----			n° planta ⁻¹	cm ³ planta ⁻¹
Testemunha	52,9 ^{ns}	39,0 ^{ns}	13,8b	1,5 ^{ns}	28,0b	52,5b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	55,5	41,7	22,2a	1,7	45,0a	87,5a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	53,9	45,6	23,2a	1,8	48,4a	91,3a
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	56,3	40,2	16,9b	1,3	21,6b	66,3b
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	54,9	40,8	22,0a	1,7	59,9a	58,1b
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	55,5	39,0	22,0a	1,9	93,3a	53,8b
<i>Bj + Bacillus pumilus</i>	56,1	42,1	22,3a	1,4	27,8b	76,3a
<i>Bj + Bacillus amyloliquefaciens</i>	53,9	41,7	25,1a	1,3	17,3b	85,0a
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	57,0	41,0	20,8a	1,6	30,4b	72,5b
<i>Bj + Bio bokashi</i>	55,9	40,6	27,5a	1,5	30,4b	71,3b
Média	55,4	41,2	21,0	1,6	40,4	71,4
CV (%)	4,3	8,1	21,1	16,5	49,1	21,9

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade do erro; * Médias não seguidas pela mesma letra diferem

entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$); CV: coeficiente de variação; *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*.

Na tabela 2, é verificada interação significativa para o número de nódulos ($p < 0,05$), onde observou-se quatro tratamentos responsivos. A inoculação com *B. japonicum*, e a coinoculação com *A. brasilense*, *P. fluorescens* e *B. subtilis*, respectivamente com 45.0, 48.4, 59.9 e 93.3 NN. Este caractere aumentou conforme feita a inoculação e coinoculação, com um aumento linear, ou seja, de acordo com a associação das bactérias inoculadas, contribuiu de forma eficaz no aumento da nodulação nas plantas.

A associação com diferentes microrganismos tem um efeito sinérgico com resposta positiva entre bactérias simbióticas (*B. japonicum*) e diazotróficas (*A. brasilense*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*), resultando na potencialização da nodulação e maior crescimento radicular que é realizada por bactérias simbióticas. Além disso, bactérias diazotróficas induzem a produção de genes para que ocorra a nodulação (BÁRBARO, et al., 2009). Com isso, a coinoculação pode apresentar melhor desempenho quando comparado ao tratamento de inoculação padrão com a utilização de uma bactéria isolada.

De forma semelhante ocorre com os resultados encontrados no VR das plantas, onde a testemunha apresentou o menor volume por cm^3 por planta, destacando-se a inoculação com *B. japonicum* e a coinoculação com o *A. brasilense*, com incrementos de 66,6 e 94 % respectivamente. Estes incrementos se devem ao fato de os microrganismos possuírem mecanismos de ação capazes de alterar a estrutura morfológica, os quais tem como efeito típico promover o crescimento e volume das raízes, alterando os estímulos hormonais da planta, controlando ou competindo com microrganismos patogênicos, aumentando a aquisição de água e nutrientes para as plantas, atuando na melhoria do solo e regulação de fitohormônios (JACOBY et al., 2017; MEENA et al., 2018; LÜ; ZOU; WU, 2018).

Silva et al. (2019) em seu trabalho, encontraram resultados de NN e VR semelhantes aos analisados neste trabalho. Também verificaram que a coinoculação por sementes com *B. japonicum* em conjunto com outras bactérias, proporcionaram incremento no número e na matéria seca de nódulos, volume e matéria seca da raiz, e ainda matéria seca da parte aérea, quando comparado à testemunha. Para Barbosa et al., (2021), a utilização da coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense* aumenta significativamente a produtividade de grãos de soja, a nodulação e o crescimento radicular.

Quanto aos parâmetros fisiológicos (Tabela 3), não houve diferença estatística entre os tratamentos para condutância estomática, concentração intracelular de CO_2 e taxa de transpiração. Contudo, pode-se observar que a inoculação com *B. japonicum* e a coinoculação

com *A. brasilense*, *T. asperelloides*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e Bio bokashi obtiveram maior taxa líquida de assimilação de carbono (A) e eficiência do uso da água (EUA) quando comparado à testemunha.

Na avaliação da taxa de assimilação líquida de CO₂ (Tabela 3) a maior variação fotossintética apresentada entre o controle e os demais tratamentos ocorreu com a coinoculação com o *B. pumilus*, sendo 46,4 % superior a testemunha e 17,4 % quando comparado à média dos demais tratamentos com presença de bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento. Segundo Noronha (2023), quando se tem uma maior taxa de fotossíntese nas plantas com a bactéria, atribui-se ao processo de fixação de N e a função hormonal secretora reguladora de crescimento.

Santos et al., (2021) corrobora, e afirma que a coinoculação com bactérias multifuncionais e fungos selecionados no Brasil se destacam como fortes produtores de fitohormônios, particularmente ácido indolacético, com grande capacidade de promoção de crescimento das raízes, incrementando a absorção de água e nutrientes pelas plantas, as quais podem resultar em melhorias nos aspectos nutricionais e de tolerância a estresses.

Tabela 3. Taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (Gs), concentração intracelular de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) em folhas de soja aos 44 dias após a emergência (DAE) em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.

Tratamentos	A	Gs	Ci	E	EUA
	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ppm	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
Testemunha	12,5b	171,8 ^{ns}	251,6 ^{ns}	2,8 ^{ns}	4,3b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	16,8a	218,4	246,4	3,3	5,1a
<i>Bj</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>	16,1a	234,2	253,4	3,4	4,8a
<i>Bj</i> + <i>Trichoderma asperelloides</i>	16,6a	222,2	249,8	3,4	5,0a
<i>Bj</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15,0b	203,0	254,4	3,2	4,8a
<i>Bj</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	13,4b	200,6	261,3	3,3	4,1b
<i>Bj</i> + <i>Bacillus pumilus</i>	18,3a	264,3	256,6	3,7	5,1a
<i>Bj</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	13,4b	187,2	261,7	3,0	4,3b
<i>Bj</i> + <i>Bacillus megaterium</i>	16,7a	235,6	255,1	3,4	4,9a
<i>Bj</i> + Bio bokashi	17,5a	240,3	251,4	3,6	5,0a
Média	15,6	217,8	254,2	3,3	4,7
CV (%)	24,7	31,3	7,4	28,3	14,5

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade do erro; * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$); CV: coeficiente de variação; *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*.

A EUA é uma variável que é afetada principalmente pelas condições de crescimento

das plantas, não sendo uma consequência direta do funcionamento estomático e fotossintético. De acordo com estudos realizados por Tardieu et al., (2013), o aumento da EUA é uma forma da planta elevar a tolerância a condições de baixa disponibilidade hídrica. No entanto, vale salientar que nessa pesquisa as plantas estavam em condições controladas de casa de vegetação, onde possivelmente tenha características de resultados distintos daqueles obtidos a campo.

Contudo, existem várias respostas para as alterações fisiológicas em plantas de soja, que variam principalmente devido à ocorrência de estresses, a sua duração, à intensidade e à frequência em que ocorrem. Segundo Ferrari et al., (2015), em menor ou maior intensidade os estudos mostram que plantas submetidas a períodos de escassez de água reduzem o potencial hídrico foliar e a assimilação de carbono, e aumentam a eficiência do uso da água. Para Chavarria et al., (2015), em períodos de estresses, sobretudo o hídrico, ocorre a redução da fixação biológica de nitrogênio, da taxa fotossintética e do crescimento de plantas, sendo que em torno de 14% do carbono assimilado vai ser enviado para as bactérias diazotróficas em troca de compostos nitrogenados.

Divergindo dos resultados observados no sistema radicular, onde houve interação dos microrganismos, estes não interferiram no estado nutricional das plantas. Nesse estudo, observou-se que não houve alterações significativas nos teores de N, P e K no tecido foliar das plantas de soja em função dos tratamentos com a utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação da soja, independentemente do uso ou não de microrganismos (Tabela 4).

Por outro lado, embora os tratamentos não diferirem estatisticamente os teores desses macronutrientes, esperava-se um possível aumento dos teores de N encontrados no tecido foliar em função da fixação biológica de nitrogênio realizada pela inoculação da bactéria *B. japonicum* e de sua coinoculação por meio da relação de simbiose com a planta sob efeito de condições controladas em casa de vegetação. Estes, no entanto, se encontram abaixo da faixa considerada adequada para a cultura da soja (45 a 65 g kg⁻¹) (EMBRAPA, 2020).

Valadão et al. (2015) ressalta que as bactérias responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio são organismos aeróbicos, que necessitam de condições adequadas para apresentar boa eficiência. Entretanto, apesar do pH corrigido, solo peneirado, temperatura controlada, disponibilidade de água diária, concentração, dose e pureza dos inoculantes garantidos pelo fabricante, neste estudo não houve respostas significativas em relação aos teores nutricionais das plantas.

De acordo com o trabalho de Schneider et al. (2017), em que os mesmos avaliaram o

teor de N foliar, verificaram que o acúmulo de N em tecido foliar das plantas de soja varia de acordo com as combinações das doses de inoculantes em estágio V5. Porém, quando analisados em R2 não houve diferença estatística entre os tratamentos com e sem inoculação no teor de N nas folhas. Pois no estágio R1/R2 tem-se um elevado acúmulo de matéria seca e nutriente pela planta, processo que se inicia nas folhas, caules e raízes, e a partir deste ponto começa a translocar parte dos nutrientes, inclusive o N, para as flores e depois para as vagens e sementes, reduzindo o teor de N das folhas. (FAGAN et al. 2007).

Tabela 4. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja no estágio fenológico R1, em função da utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação. Santa Maria, RS. 2022.

Tratamentos	N	P	K
	----- g kg ⁻¹ -----		
Testemunha	21,8 ^{ns}	3,2 ^{ns}	11,1 ^{ns}
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	31,6	2,8	15,3
<i>Bj</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>	41,5	3,0	14,6
<i>Bj</i> + <i>Trichoderma asperelloides</i>	23,1	3,0	12,6
<i>Bj</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27,8	3,2	15,4
<i>Bj</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	24,7	2,7	14,1
<i>Bj</i> + <i>Bacillus pumilus</i>	24,9	2,9	13,8
<i>Bj</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	23,9	4,9	15,8
<i>Bj</i> + <i>Bacillus megaterium</i>	24,3	3,1	15,4
<i>Bj</i> + Bio bokashi	34,1	3,0	16,0
Média	27,8	3,2	14,4
CV (%)	32,4	31,6	17,1

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade do erro; * Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$); CV: coeficiente de variação; *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*.

Os valores de P considerados adequados no tecido vegetal da soja segundo a Embrapa (2020) estão entre 2,8 - 4,5 g kg⁻¹. Em estudo realizado por Kurihara (2013), a suficiência do teor de P no tecido foliar considerado suficiente ficou entre 2,8 e 3,3. Valor inferior a 2,8 é considerado baixo, 3,4 a 3,9 alto e maiores que 3,9 considerados como excesso. Em ambas recomendações, os teores de P no tecido vegetal das plantas deste ensaio encontram-se dentro do aceitável, com uma média geral de 3,2 g kg⁻¹ (Tabela 4), mas sem diferenças significativas entre os tratamentos.

Shastri e Kumar (2019), verificaram que a utilização de bactérias pode ser uma opção para um aumento da concentração de P disponível ao longo do tempo, possibilitando

evidenciar a capacidade de alocação dos níveis de P no tecido das plantas através dos mecanismos, como a biosolubilização de fosfato e mobilização de potássio através da produção de sideróforos.

De acordo com Alari et al., 2017, a tecnologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de nutrientes é uma estratégia que apesar de cuidados intrínsecos e do ambiente, pode possibilitar solubilização e aumento de nutrientes pelos seus mecanismos os quais favorece a absorção destes pelas plantas e assim, reduzir também o uso de fertilizantes químicos sintéticos que causam impacto negativo no meio ambiente

Os teores de K no tecido vegetal foram semelhantes em todos os tratamentos com uma média de 14,4 g kg⁻¹, não significativos entre si. Divergindo do estudo realizado por Stammer e Mallarino (2018), onde obtiveram resultados positivos e os quais identificaram uma correlação entre rendimento e os teores de fósforo e potássio no tecido foliar de plantas de soja.

4. CONCLUSÕES

A inoculação de *B. japonicum* na soja é eficiente, aumenta a massa seca das raízes, volume radicular, nodulação, taxa líquida de assimilação de carbono e eficiência do uso da água.

As coinoculação de *B. japonicum* com bactérias é benéfica e estimula um maior aporte de massa seca de raiz nas plantas.

A bactéria *A. brasilense* incrementa maior massa seca de raiz, número de nódulos e volume radicular quando comparada a inoculação simples de *B. japonicum*, sendo esta, uma boa escolha para coinoculação.

A utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação não influencia na nutrição dos tecidos vegetais.

REFERÊNCIAS

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 971, 2017.

BÁRBARO I. M. et al. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e coinoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 1, p. 01-07, 2009.

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, 2021.

BASSO, C. J. **Épocas de aplicação de nitrogênio para o milho cultivado em sucessão a plantas de cobertura de solo, no sistema plantio direto**. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 581-588, 2009.

CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489-499, 2012.

CHAVARRIA, G.; DURIGON, M.R.; KLEIN, V.A.; KLEBER, H. Restrição fotossintética de plantas de soja sob variação de disponibilidade hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n. 8, p. 1387-1393, 2015.

CQFS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS / SC. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Porto Alegre, 2016. 376p.

CUMMINGS, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. **Environmental Biotechnology**, v. 5, p. 43–50, 2009.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja**. Londrina, Embrapa Soja, 2020. 347p.

FAGAN, E. B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 1, p. 89-106. 2007.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. (Special Report, 80). Ames: Iowa State University, 1977, p. 12.

FERRARI, E.; DA PAZ, A.; SILVA, A. C. DA. Déficit hídrico e altas temperaturas no metabolismo da soja em sementeiras antecipadas no Mato Grosso. **Nativa**. v. 3, n. 1, p. 67-77, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

- HUNGRIA, M. et al. Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 112, n. 6, p. 5222-5236, 2020.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801, 2013.
- JACOBY, R. et al. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–19, 2017.
- KURIHARA, C. V. et al. Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em algodão e em soja, definidas em função de índices DRIS1. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 412-419, 2013.
- LÜ, L.; ZOU, Y.; WU, Q. Relationship between arbuscular mycorrhizas and plant growth: improvement or depression? *In*: GIRI, B., PRASAD, R., VARMA, A. (eds) Root Biology. **Soil Biology**, v. 52, 2018, p. 451–464.
- MALTY, J. S; SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 285-291, 2006.
- MARCHIORI, L. F.; CÂMARA, G. M.; PEIXOTO, C. P.; MARTINS, M. C. Desempenho vegetativo de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em épocas normal e safrinha. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 383-390. 1999.
- MARTIN, T. N.; et al. **Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja**. Santa Maria: Editora GR, p. 528, 2022.
- MEDEIROS C. et al. Gene characterization of *Bradyrhizobium* spp. strains contrasting in biological nitrogen fixation efficiency in soybean. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, p. 3067–3080, 2020.
- MEENA, R. S. et al. Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 207–223, 2018.
- MEYER C. M.; et al. **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022, p. 550.
- NORONHA, R. P. P. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium japonicum* e bactérias promotoras do crescimento**. Dissertação de mestrado em Agronomia no Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. 2023. Disponível em: <https://sigpos.uems.br/uems-sigpos/portal/trabalho-arquivos/download/3477>
- O'CALLAGHAN, M.; BALLARD, R. A.; WRIGHT, D. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. **Soil Use and Management**, v. 38, p. 1340–1369, 2022.
- QUIROZ, M.; CÉSPEDES, C. Bokashi as an amendment and source of nitrogen in sustainable agricultural systems: A review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 19, p. 237-248, 2019.

SAAD, M. et al. Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 13, p. 3878-3901, 2020.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Embrapa, Brasília. 5^a ed. 2018.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Embrapa, Brasília. 5^a ed. 2018.

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

SCHNEIDER, F.; PANIZZON, L. C.; SORDI, A.; LAJÚS, C. R.; CERICATO, A.; KLEIN, C. Eficiência agrônômica da cultura da soja (*Glycine max* (L) Merrill) submetida a coinoculação. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 4, p. 72-79, 2017.

SCHWAAB, E. F.; AGUIAR, C. G. Interação de inoculantes nitrogenados com *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* em soja. **Revista Cultivando o Saber**. V edição especial, p. 24-32, 2019.

SHASTRI, B.; KUMAR, R. Microbial secondary metabolites and plant–microbe communications in the rhizosphere. *In*: SINGH, J. S. (Eds) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Microbes in Soil, Crop and Environmental Sustainability**, p. 93-111, 2019.

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, 2019.

STAMMER, A. J.; MALLARINO, A. P. Plant tissue analysis to assess phosphorus and potassium nutritional status of corn and soybean. **Soil Science Society of America Journal**, v. 82, p. 260-270, 2018.

TARDIEU, F. Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. **Frontiers in Physiology**. v. 4, n. 17, p. 1-11, 2013.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHMEN, H. **Análise de solo, plantas e outros minerais**. Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia. Porto Alegre: UFRGS, p. 174, 1995.

VALADÃO, F. C. A. et al. Adubação fosfatada e compactação do solo: sistema radicular da soja e do milho e atributos físicos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 243-255, 2015.

VLEESSCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Rhizobacteria-induced systemic resistance. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 223–281, 2009.

CAPÍTULO 2. FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA SOJA CULTIVADA EM TERRAS BAIXAS

RESUMO

A utilização de microrganismos multifuncionais beneficia diretamente o crescimento e desenvolvimento de plantas em decorrência da produção de fitormônios e sideróforos, suprimento de nutrientes e assimilação de nitrogênio atmosférico (N₂); bem como, indiretamente, por proteger as plantas contra patógenos. Dessa forma, a busca por sistemas agrícolas sustentáveis com tecnologias de cultivo que proporcionem incrementos produtivos e minimizem custos de produção e impactos negativos ao ambiente é de grande. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação de microrganismos via tratamento de sementes e sulco de semeadura no cultivo da soja em terras baixas. Foram realizados dois experimentos em condição de campo, um no município de Santa Maria-RS e outro em Candelária-RS, o delineamento experimental empregado para ambos foi o de blocos ao acaso em parcela subdividida, com quatro repetições. Nas parcelas principais foram distribuídas duas formas de aplicação: a) semente e b) sulco de semeadura. Nas subparcelas foram distribuídas oito associações entre microrganismos: 1) Testemunha (sem inoculação); 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa CCT 4065 SEMIA 586); 3) *B. japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145); 4) *B. japonicum* + *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF 94/17); 5) *B. japonicum* + *Pseudomonas fluorescens* (Cepa CCT 0595 ATCC 13525); 6) *B. japonicum* + *Bacillus subtilis* (Cepa CCT 3131 ATCC 6051); 7) *B. japonicum* + *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350) e 8) *B. japonicum* + *Bacillus megaterium* (Cepa CBMAI 2222). Foram realizadas avaliações biométricas, fisiológicas e químicas. Onde foi possível inferir que a inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* na soja é eficiente, contribuindo na estatura das plantas, taxa de cobertura do dossel vegetativo, no maior aporte do sistema radicular, nodulação e produtividade de grãos. A utilização da técnica de coinoculação de microrganismos multifuncionais junto ao *B. japonicum* é benéfica, onde a bactéria *A. brasilense* apresenta potencial para incrementar o crescimento radicular das plantas e da produtividade de grãos. A aplicação de microrganismos não influencia nos teores nutricionais dos tecidos vegetais. E a forma de aplicação de microrganismos em sulco de semeadura é mais produtiva e assertiva, nas condições de Santa Maria, favorecendo aumento na população inicial de plantas, taxa de cobertura do dossel vegetativo e produtividade de grãos.

Palavras-chave: bioinsumos, inoculante, inoculação no sulco de semeadura, organismos multifuncionais

INOCULATION AND COINOCULATION FORMS OF MICROORGANISMS IN SOYBEAN CULTIVATED IN LOWLANDS

ABSTRACT

The use of multifunctional microorganisms directly benefits the growth and development of plants due to the production of phytohormones and siderophores, supply of nutrients and assimilation of atmospheric nitrogen (N₂); as well as, indirectly, by protecting plants against pathogens. Therefore, the search for sustainable agricultural systems with cultivation technologies that provide productive increases and minimize production costs and negative impacts on the environment is great. Therefore, the objective was to evaluate the effects of inoculation and coinoculation of microorganisms via seed treatment and sowing furrow in soybean cultivation in lowlands. Two experiments were carried out in field conditions, one in the municipality of Santa Maria-RS and the other in Candelária-RS, the experimental design used for both was randomized blocks in a subdivided plot, with four replications. Two forms of application were distributed in the main plots: a) seed and b) sowing furrow. Eight associations between microorganisms were distributed in the subplots: 1) Control; 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa CCT 4065 SEMIA 586); 3) *B. japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145); 4) *B. japonicum* + *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF 94/17); 5) *B. japonicum* + *Pseudomonas fluorescens* (Cepa CCT 0595 ATCC 13525); 6) *B. japonicum* + *Bacillus subtilis* (Cepa CCT 3131 ATCC 6051); 7) *B. japonicum* + *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350) and 8) *B. japonicum* + *Bacillus megaterium* (Cepa CBMAI 2222). Biometric, physiological and chemical assessments were carried out. Where it was possible to infer that the inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* in soybeans is efficient, contributing to plant height, vegetative canopy coverage rate, greater root system input, nodulation and grain productivity. The use of the coinoculation technique of multifunctional microorganisms with *B. japonicum* is beneficial, where the *A. brasilense* bacterium has the potential to increase plant root growth and grain productivity. The application of microorganisms does not influence the nutritional content of plant tissues. And the way of applying microorganisms in the sowing furrow is more productive and assertive, under Santa Maria conditions, favoring an increase in the initial plant population, vegetative canopy coverage rate and grain productivity.

Keywords: bioinputs, inoculant, inoculation in the sowing furrow, multifunctional organisms

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é uma das dez maiores economias do mundo segundo dados da Austin Rating, com um PIB (Produto Interno Bruto) nominal de US\$ 2,6 trilhão no primeiro trimestre deste ano (IBGE, 2023). O setor agropecuário impacta diretamente nesse resultado, tendo a soja como uma das commodities responsáveis pelo desenvolvimento da cadeia produtiva brasileira, gerando significativos impactos sociais e econômicos em todas as regiões do País, desde a criação de empregos a movimentação de capital (HIRAKURI, 2021).

Diante dessa representatividade há inúmeros e consistentes avanços em pesquisas explorando o potencial genético da soja, contemplando adaptações aos estresses abióticos (seca e encharcamento) e bióticos (doenças e pragas); a incorporação de boas práticas agrícolas para o manejo do solo, da água e da fertilidade; o manejo integrado de pragas e o desenvolvimento de sistemas integrados de produção animal e vegetal (EMYGDIO et al., 2017).

Na cultura da soja, há o crescimento e intensificação do uso de bioinsumos, com a utilização de microrganismos como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas favorecendo o aumento da produtividade de grãos (MAPA, 2021). Na safra 2020/2021 a adoção do uso de inoculantes na cultura da soja no Brasil foi de 80%, enquanto a adoção da coinoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* foi de 26% (MEYER et al., 2022), sendo indiscutível o sucesso da tecnologia e o seu uso para a cultura, tanto para a garantia da fixação biológica de nitrogênio por meio das bactérias, como também para outras ações como solubilização de fósforo.

Entretanto, a forma de inoculação e de coinoculação pode influenciar a eficiência destes, visto que a aplicação tradicionalmente feita via semente nem sempre é eficaz, podendo ser afetada pela umidade e temperatura do solo no momento da semeadura, tempo entre a inoculação e a semeadura, pelo uso de produtos químicos no tratamento de sementes podem causar toxidez aos microrganismos, entre outros fatores (TOCHETO; BOIAGO, 2020).

Segundo Silva et al. (2011) visando reduzir problemas, tais como: a incompatibilidade de inoculantes e fungicidas, limite de calda na semente, excesso de manuseio e consequentes danos mecânicos, a principal alternativa é a aplicação dos inoculantes diretamente no sulco de semeadura por meio de jato dirigido, evitando o contato direto dos microrganismos com os tratamentos químicos utilizados nas sementes. No entanto, essa forma de aplicação apresenta custos iniciais maiores, devido ao custo de maior quantidade da dose de inoculante, despesas de maior quantidade de água e ajustes das semeadoras (ZILLI et al., 2010).

Portanto, para melhor utilização e ampliação do uso desta tecnologia é imprescindível

mais estudos sobre as formas de aplicação de inoculantes e o efeito de microrganismos principalmente em áreas que apresentam características únicas, como as áreas de terras baixas com solos hidromórficos, principalmente devido o avanço da intensificação das áreas de arroz com a implantação da soja. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação de microrganismos via tratamento de sementes e sulco de semeadura no cultivo da soja em terras baixas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em dois locais, a campo, um na área didático experimental de várzea do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e o outro em uma propriedade rural localizada no município de Candelária - RS, na safra agrícola 2021/22. O clima da região é caracterizado como subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen e solo de ambas as áreas é classificado como Planossolo Háptico Eutrófico arênico, pertencente à unidade de mapeamento Vacacaí (SANTOS et al, 2018), com as seguintes características químicas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise físico-química dos solos experimentais realizados em Santa Maria (RS) e Candelária (RS), na safra de 2021/22.

Local	Camada (cm)	Argila ---%---	pH _{água}	P ---mg dm ⁻³ ---	K ---mg dm ⁻³ ---	Ca ---cmol _c dm ⁻³ ---	Mg	MO	Al ---%---
Santa Maria	0 - 20	19	5,9	9,2	30	5,8	2,7	1,7	2,1
Candelária	0 - 20	24	4,3	5,9	63,3	2,9	0,5	0,9	30,2

Argila, pH (potencial hidrogeniônico) em água, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), matéria orgânica (MO) e saturação por alumínio (Al).

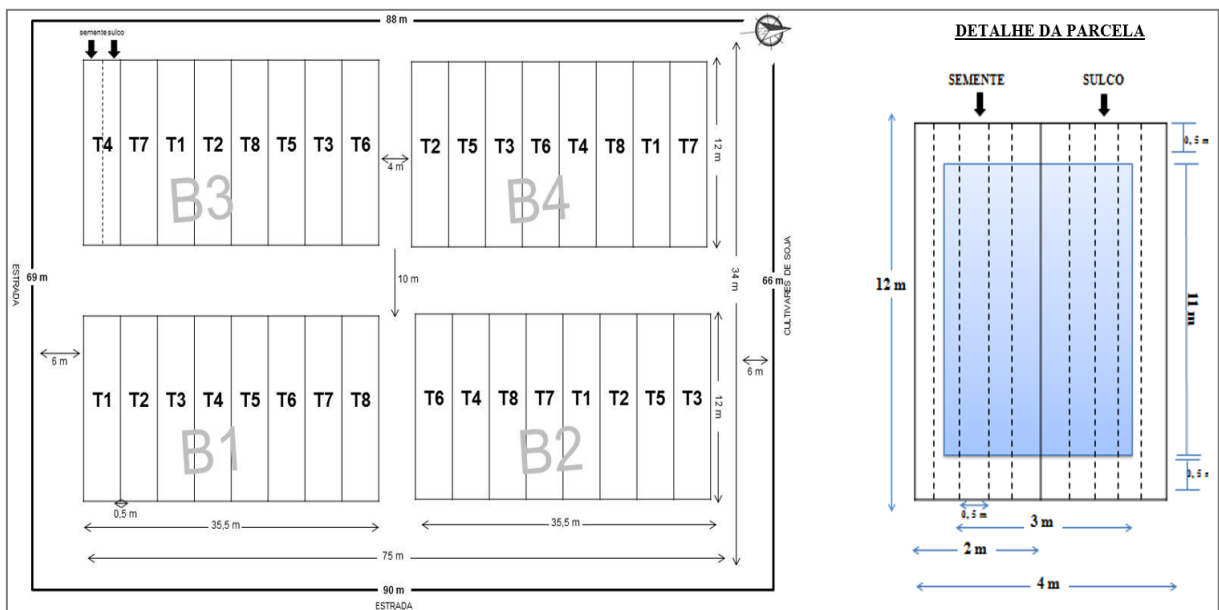
O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso, bifatorial 2 x 8 com parcela subdividida, com quatro repetições. Nas parcelas principais foram distribuídas duas formas de aplicação: a) semente e b) sulco de semeadura. Nas subparcelas foram distribuídas oito associações com microrganismos: 1) Testemunha (sem inoculação); 2) *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa CCT 4065 SEMIA 586); 3) *B. japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Cepa CCT 8053 ATCC 29145); 4) *B. japonicum* + *Trichoderma asperelloides* (Cepa MMBF 94/17); 5) *B. japonicum* + *Pseudomonas fluorescens* (Cepa CCT 0595 ATCC 13525); 6) *B. japonicum* + *Bacillus subtilis* (Cepa CCT 3131 ATCC 6051); 7) *B. japonicum* + *Bacillus amyloliquefaciens* (Cepa CCT 7690 ATCC 23350) e 8) *B. japonicum* + *Bacillus megaterium* (Cepa CBMAI 2222).

As bactérias utilizadas nas associações foram adquiridas pelo banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e multiplicadas no laboratório MULTIBAC da UFSM, ambas com uma contagem bacteriana de no mínimo 2×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. O fungo utilizado é oriundo do inoculante turfoso FT10, com concentração de 1×10^{10} UFC/g.

A dosagem recomendada para inoculação de *B. japonicum* no primeiro nível dos fatores (semente), foi de 300 mL por 40 kg^{-1} de semente e para coinoculação com as demais bactérias utilizou-se 300 mL de *B. japonicum* + 100 mL por 40 kg de sementes respectivo a cada bactéria. Para a associação com o fungo *T. asperelloides* a recomendação foi de 5 g/ha. Nesse nível, o processo da inoculação e coinoculação dos microrganismos ocorreu com a mistura dos inoculantes, de acordo com o tratamento e recomendação, onde foi realizada em um recipiente plástico e posterior aplicação direta e homogeneização nas sementes, uma hora antes da semeadura.

No segundo nível dos fatores (aplicação via sulco de semeadura) utilizou-se o dobro das doses recomendadas anteriormente, diluídas em água no pulverizador acoplado à semeadora com volume de 50 L ha^{-1} . Estabelecendo uma relação de 3:1 entre *B. japonicum* e o outro microrganismo. Sendo realizada a tríplice lavagem do tanque após a aplicação de cada tratamento/inoculante, afim de evitar contaminações.

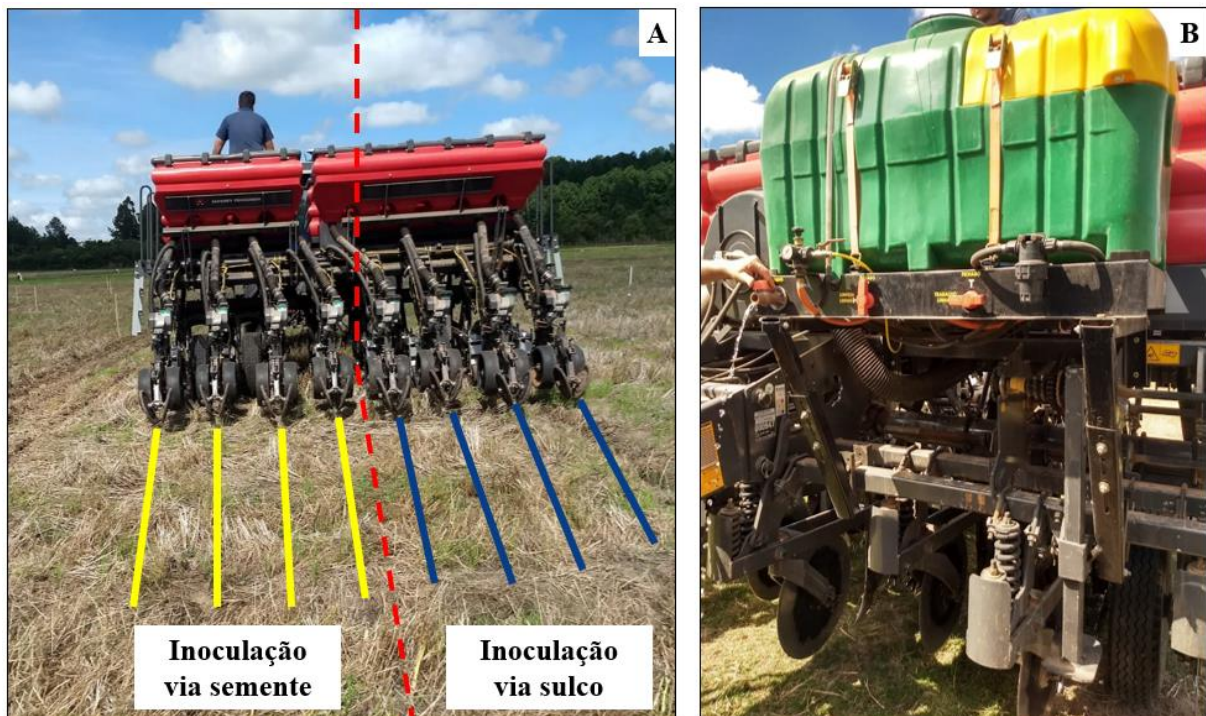
Figura 1. Croqui da área experimental e o detalhe da parcela.



A semeadura em ambas as áreas foi realizada sob sistema semeadura direta, em área anteriormente ocupada com a cultura do arroz, utilizando uma semeadora/adubadora

pantográfica constituída de 8 linhas, das quais 4 linhas foram direcionadas para a forma de aplicação dos inoculantes na semente, onde os jatos do sulco destas seções foram desligados e as outras 4 linhas destinadas a aplicação feita por meio do jato dirigido no sulco (Figura 2). A semeadura ocorreu no dia 10 de novembro de 2021 em Santa Maria e dia 22 de novembro de 2021 em Candelária, ambas com espaçamento de 0,5 m entre linhas e profundidade de 4 cm.

Figura 2. Semeadura do experimento: A - Demonstração das 4 primeiras linhas da semeadora em amarelo com a inoculação sendo realizada nas sementes onde os jatos do sulco foram desligados e em azul as 4 linhas da semeadora que tiveram a inoculação feita por meio do jato dirigido no sulco. B - Momento de limpeza do tanque para adição de outro tratamento.



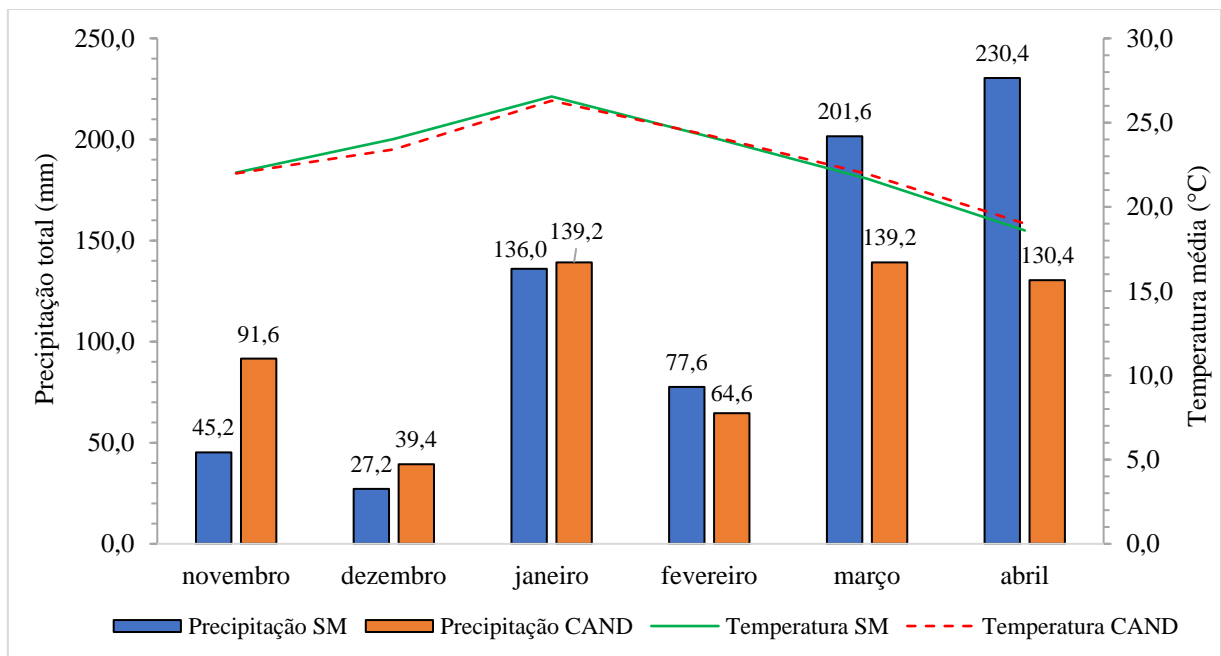
Foi utilizada a cultivar de soja CZ 15B70 IPRO na densidade de 30 plantas por m², esta apresenta grupo de maturação relativa 5.7, tipo de crescimento indeterminado, 96% de germinação, sendo estas tratadas industrialmente com o produto Standak[®] Top, o qual possui como ingredientes ativos os fungicidas piraclostrobina e tiofanato metílico (25 g i.a. e 225 g i.a.) e como inseticida o fipronil (250 g i.a.) na dose de 500 mL 100 kg⁻¹, além de recobrimento das sementes com polímero Florite[®] 1197 Green (250 mL p. c. 100 kg⁻¹ de sementes) e o pó secante Sepiret[®] PF 16 White (200 g 100 kg⁻¹ de sementes).

A adubação de base foi realizada em ambas as áreas conforme as recomendações para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS, 2016), sendo constituída de 17,5 kg

ha⁻¹ de N, 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 70 kg ha⁻¹ de K₂O, o equivalente a 350 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 05-20-20. Os demais tratos culturais, controle de doenças, pragas e insetos, foram realizados conforme as Indicações Técnicas para a Cultura da Soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2018/2019 e 2019/2020 (CARAFFA et al., 2018).

A precipitação pluvial e temperatura média do ar, durante a safra foram obtidas da estação meteorológica automática do 8° DISME/INMET, localizada no Campus da UFSM, e conforme os dados disponibilizados pelo INMET, conforme a Figura 1.

Figura 3. Precipitação total mensal (mm) e temperatura média mensal (°C) para o período de desenvolvimento da soja cultivada em Santa Maria e Candelária.



É importante destacar que no experimento implantado na UFSM em Santa Maria, foram realizadas duas irrigações por inundação intermitente, uma em dezembro e a segunda em janeiro, utilizando a estrutura já instalada para a irrigação da cultura do arroz. Dessa forma, foi feita a aplicação da lâmina de água de forma rápida, de modo que o solo não permaneceu saturado por períodos prolongados, sendo esta lâmina de água drenada do sistema em um período de no máximo 24 horas.

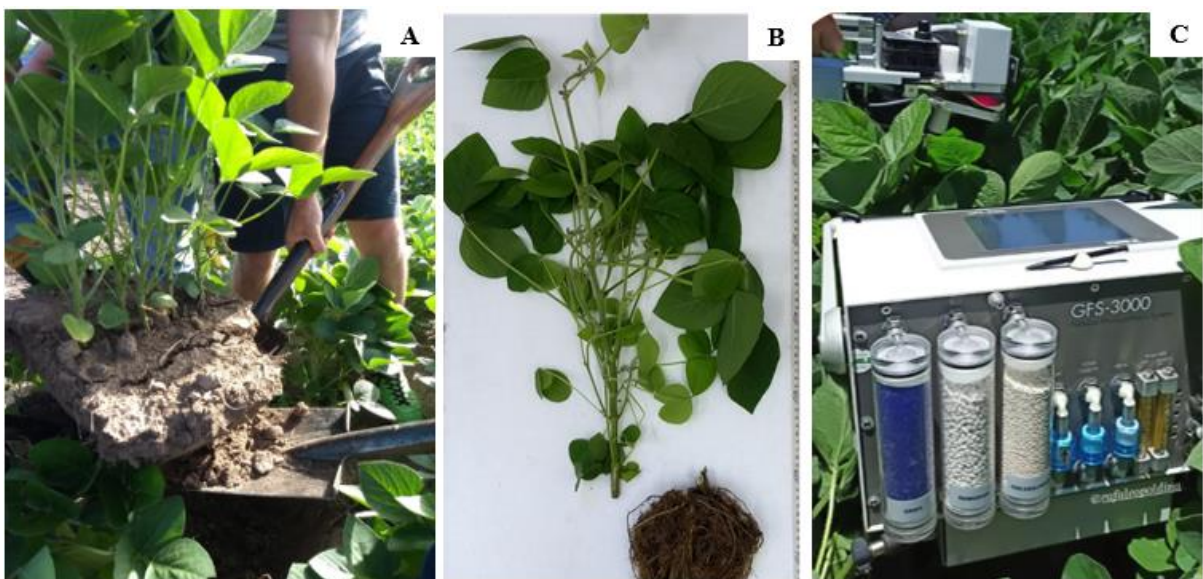
As avaliações começaram após a emergência da soja. A população inicial de plantas foi determinada por meio da contagem das plantas estabelecidas em seis metros lineares, previamente demarcados na terceira fileira de semeadura. Nos estádios V5 e R4 foram coletados em cada parcela, um monólito de solo de 0,5 x 0,4 x 0,2 m (comprimento, largura e

profundidade, respectivamente) contendo cinco plantas em sequência na fileira de cultivo, onde fez-se a retirada de três plantas centrais para avaliação. Posteriormente as raízes foram lavadas em água corrente sobre uma peneira para remoção do solo aderido. Separou-se o sistema radicular da parte aérea das plantas e os nódulos foram destacados manualmente das raízes (BRANDELERO et al, 2009).

Em seguida, foi realizada a avaliação de comprimento radicular e estatura das plantas, a qual foi determinada por meio de uma régua milimetrada pela distância compreendida entre a superfície do solo e o ápice da haste principal da planta (MARCHIORI et al., 1999). Já para avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSR) e massa seca de nódulos (MSN) foram separadas as partes, colocadas em sacos de papel, identificadas e levadas para secagem em estufa de ventilação forçada a 65° C. Após a secagem, foram pesadas em balança com precisão de 0,001g.

O percentual da taxa de cobertura do solo pelo dossel vegetativo foi obtido no estágio V5, entre as 9 e 11 horas da manhã, por meio de imagens com o uso de smartphone com câmera acoplada do topo da vegetação em ponto representativo da condição média de cada parcela para estimativa da cobertura verde do dossel. Cada imagem foi tirada a uma distância de 1 m do solo, seguindo as recomendações de uso do aplicativo Canopeo® (PATRIGNANI; OCHSNER, 2015).

Figura 4. Avaliações: A - Coleta das plantas a campo, B – Aferições em laboratório e C - Utilização do IRGA.



Aos 40 e 78 dias após a emergência (DAE), realizou-se as medições referentes às trocas gasosas das plantas do experimento de Santa Maria – RS, entre as 10 e 12 horas da

manhã, no terço médio da folha do terceiro trifólio completamente expandido do ápice para a base da planta. Foi utilizado o medidor portátil Infra Red Gas Analyzer (IRGA), marca WALZ, modelo GFS-3000, utilizando uma radiação artificial fotossintética ativa de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Avaliando a taxa líquida de assimilação de carbono (A), a condutância estomática (Gs), a concentração interna de CO_2 (Ci), a taxa de transpiração (E) e a eficiência do uso da água (EUA), sendo esta última obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e quantidade de água transpirada.

E as análises químicas dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja dos dois experimentos, foram determinadas utilizando três folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, das duas plantas por unidade experimental no estágio fenológico R1. Posteriormente, as amostras foram submetidas à moagem em moinho do tipo Willey e processadas seguindo a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

A produtividade de grãos foi determinada por meio da colheita manual da área de 9 m^2 (1,5 x 6 m). Sendo posteriormente realizada a trilha, retirada de impurezas das amostras, pesagem e a correção da umidade dos grãos para 13 % e expressos em kg ha^{-1} .

A análise estatística dos resultados obtidos foi executada com auxílio do programa Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2019), de modo que os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos de Santa Maria e Candelária estão apresentados na tabela 2, onde percebe-se que houve interação entre as formas de aplicação e os tratamentos com microrganismos em apenas uma variável, das quatro variáveis analisadas nesta tabela. Com isso, verifica-se que o efeito da interação dos fatores e níveis estudados, interferiu apenas na resposta da porcentagem da taxa de cobertura do dossel vegetativo (TCD) no estágio V5, em ambos locais, conforme demonstra os desdobramentos (Tabela 3).

Em ambos experimentos foi superior a população inicial de plantas (PIP) quando realizada a aplicação dos inoculantes em sulco de semeadura, indiferentemente dos microrganismos utilizados (Tabela 2). Houve um incremento médio no estabelecimento da PIP em Santa Maria de 6,45 % e de 6,78 % em Candelária, em relação a PIP inoculadas via semente.

Tabela 2. População inicial de plantas (PIP), estatura da planta, massa seca da parte aérea (MSPA) e taxa de cobertura do dossel vegetativo (TCD), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.

Santa Maria						
Formas de aplicação	PIP (plantas m ⁻²)	Estatura		MSPA		TCD
		(cm)		(g planta ⁻¹)		(%)
		V5	R4	V5	R4	V5
Semente	12,4b	24,1 ^{ns}	79,9 ^{ns}	7,9 ^{ns}	31,0 ^{ns}	64,8b
Sulco	13,2a	25,4	81,3	8,2	29,4	67,9a
Microrganismos						
Testemunha	11,9 ^{ns}	22,8 ^{ns}	77,6b	6,5b	25,0 ^{ns}	59,4b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	13,3	26,0	80,5a	8,0b	31,1	68,6a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	13,1	25,1	83,8a	9,8a	33,7	68,1a
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	12,6	25,0	77,5b	7,8b	31,4	65,3a
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	12,7	24,5	78,1b	8,1b	29,2	68,6a
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	12,9	25,2	81,9a	8,4b	29,0	65,5a
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	13,3	25,4	81,7a	7,5b	31,6	66,3a
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	12,8	23,9	83,7a	8,2b	30,7	69,0a
Média	12,8	24,7	80,6	8,0	30,2	66,4
C.V. 1 (%)	7,93	16,3	6,1	14,8	17,8	6,26
C.V. 2 (%)	4,76	10,9	6,1	13,9	15,4	4,45
Candelária						
Formas de aplicação	PIP (plantas m ⁻²)	Estatura		MSPA		TCD
		(cm)		(g planta ⁻¹)		(%)
		V5	R4	V5	R4	V5
Semente	11,8b	25,5 ^{ns}	79,2 ^{ns}	8,6 ^{ns}	26,2b	81,5b
Sulco	12,6a	25,7	80,1	8,7	28,5a	83,9a
Microrganismos						
Testemunha	11,2 ^{ns}	25,0b	78,0 ^{ns}	8,5 ^{ns}	26,0 ^{ns}	75,9b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	12,3	26,1a	79,1	8,2	27,1	83,5a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	12,0	25,2b	78,5	8,1	24,1	81,8a
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	12,2	26,4a	80,3	9,3	27,7	83,0a
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	13,1	26,8a	84,4	8,6	29,6	85,7a
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	12,1	25,0b	80,1	9,1	28,2	85,0a
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	12,4	24,9b	75,8	8,8	26,5	84,3a
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	12,2	24,5b	80,8	8,5	29,5	82,2a
Média	12,2	25,6	79,6	8,6	27,3	82,7
C.V. 1 (%)	8,5	4,8	6,6	14,8	16,2	5,5
C.V. 2 (%)	7,3	6	6,3	14,5	15,9	3,8

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. C.V.1: coeficiente de variação da parcela principal e C.V.2: coeficiente de variação da subparcela. Bj: *Bradyrhizobium japonicum*.

De acordo com Vieira Neto et al. (2008), uma justificada para essa diferença se dá pela calda com volume de água utilizada para diluir o inoculante na água, que é feita para aplicação via sulco no momento da semeadura, a qual facilita uma melhor distribuição e sobrevivência das bactérias na semente e no solo, afastando os microrganismos aplicados da superfície e posicionando-os onde há uma menor oscilação de temperatura e umidade, criando um “micro ambiente” devido ao volume de água adicionada no pulverizador junto a semeadura. Condicionando em uma maior assertividade pela melhor localização para infectar as raízes da soja, ao contrário da inoculação na semente, onde as bactérias ficam mais expostas aos tratamentos químicos aplicados nas sementes e as intemperes e condições do solo no momento da semeadura.

No entanto, a quantidade de água aplicada via sulco é praticamente irrisória. Podendo esta ser calculada em um valor de aproximadamente 2,5 mL de calda por metro de solo, contudo um volume maior de L ha⁻¹ poderá vir a criar um ambiente mais úmido, garantindo uma melhor e maior sobrevivência as bactérias. As quais secretarão reguladores de crescimento que penetram no tegumento da semente, junto a água durante o processo de embebição e que são capazes de alterar a intensidade das reações relacionadas à germinação, e consequentemente refletir posteriormente no estande de plantas final e no desenvolvimento da cultura (CASSÁN et al., 2009).

A massa seca da parte aérea (MSPA), foi responsiva no estágio vegetativo com a coinoculação de *A. brasilense*, a qual obteve 50,7 % de ganho, duas vezes a mais que a testemunha não inoculada (Tabela 2). Em relação a estatura das plantas os resultados demonstram que a inoculação simples de *B. japonicum* proporciona médias e diferenças significativas maiores quando comparadas com a testemunha, sendo estas por vezes menores quando há a coinoculação com mais uma bactéria ou fungo.

Quanto a percentagem da taxa de cobertura do dossel vegetativo, é possível observar que apesar de existir um padrão referente aos efeitos dos microrganismos sobre a soja cultivada em áreas de terras baixas, existem variações quanto as respostas das formas de aplicação x microrganismos devido ao solo e as condições edafoclimáticas de cada lugar (Tabela 3).

Verifica-se também, que a resposta da inoculação com *B. japonicum* e da coinoculação com demais microrganismos é variável, independente da forma de aplicação e dependente das condições ambientais durante o crescimento e desenvolvimento da cultura, especialmente a baixa taxa de precipitação e acidez do solo, interferindo diretamente na fixação biológica de nitrogênio, parte aérea e sobretudo na nodulação das raízes.

Tabela 3. Desdobramento da interação formas de aplicação versus microrganismos para a taxa de cobertura do dossel vegetativo - TCD (%), avaliada em V5 nos experimentos de Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.

Microrganismos	Formas de aplicação			
	Santa Maria		Candelária	
	semente	sulco	semente	sulco
Testemunha	59,0b	59,9b	74,7b	77,2b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	67,4Ab	69,9Ab	83,0Ab	84,0Ab
<i>Bj</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>	67,4Ab	68,9Ab	82,5Ab	81,0b
<i>Bj</i> + <i>Trichoderma asperelloides</i>	61,1b	69,5Aa	79,9Ab	86,1Aa
<i>Bj</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	66,7Ab	70,5Ab	83,6Ab	87,8Ab
<i>Bj</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	62,1Ab	68,9Aa	83,4Ab	86,7Ab
<i>Bj</i> + <i>Bacillus amyloliquenfacies</i>	65,5Ab	67,1Ab	82,9Ab	85,8Ab
<i>Bj</i> + <i>Bacillus megaterium</i>	69,3Ab	68,7Ab	82,0Ab	82,4b
Média	66,4		82,7	
C.V. (%)	5,3		4,7	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%. C.V.: coeficiente de variação. *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*.

Para o comprimento das raízes (CR), massa seca radicular (MSR) e massa seca de nódulos (MSN), não houve respostas significativas em relação a forma de aplicação em ambos locais (Tabela 4). Apenas em Santa Maria, que a coinoculação de *B. japonicum* com *A. brasilense* foi superior no estágio R4 em todas variáveis do sistema radicular. Além dessa bactéria, fica evidente na MSN que a aplicação desses microrganismos promotores de crescimento favorece positivamente o aumento da nodulação da soja.

Tabela 4. Comprimento radicular (CR), matéria seca do sistema radicular (MSR), matéria seca de nódulos (MSN), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.

Formas de aplicação	Santa Maria					
	CR		MSR		MSN	
	(cm)		(g planta ⁻¹)		(mg planta ⁻¹)	
	V5	R4	V5	R4	V5	R4
Semente	16,7 ^{ns}	23,6 ^{ns}	1,6 ^{ns}	5,8 ^{ns}	504,8 ^{ns}	861,3 ^{ns}
Sulco	16,6	23,1	1,8	6,0	510,8	924,2
Microrganismos						
Testemunha	13,6 ^{ns}	20,4b	1,4 ^{ns}	4,7d	467,6b	617,7b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	16,8	26,8a	1,7	6,4b	539,5a	948,3a
<i>Bj</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>	16,7	26,0a	1,8	7,3a	562,1a	1076,5a

<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	18,4	24,7a	1,9	5,8c	489,0b	902,7a
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	17,9	22,9b	1,9	5,5c	466,2b	922,6a
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	16,4	22,5b	1,7	5,9c	483,3b	844,2a
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	16,5	21,3b	1,7	6,1c	503,8b	893,3a
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	17,0	22,2b	1,7	5,6c	551,0a	936,7a
Média	16,7	23,3	1,7	5,9	507,8	892,7
C.V. 1 (%)	17,3	10,9	15,7	13,7	11,0	17,0
C.V. 2 (%)	20,9	14,8	19,3	13,8	15,2	21,3
Candelária						
Formas de aplicação	CR		MSR		MSN	
	(cm)		(g planta ⁻¹)		(mg planta ⁻¹)	
	V5	R4	V5	R4	V5	R4
Semente	19,4 ^{ns}	17,3 ^{ns}	1,0 ^{ns}	4,1 ^{ns}	622,2 ^{ns}	1180,3 ^{ns}
Sulco	19,3	17,3	1,1	4,1	626,3	1276,3
Microrganismos						
Testemunha	18,9 ^{ns}	16,7 ^{ns}	0,9 ^{ns}	3,8 ^{ns}	488,8 ^{ns}	1036,6 ^{ns}
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	20,7	19,5	1,1	4,3	643,7	1246,5
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	21,2	17,5	1,2	4,7	587,7	1266,9
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	17,4	16,0	1,0	3,6	702,2	1477,7
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	20,4	17,3	1,0	4,5	610,6	1241,6
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	18,5	17,9	1,0	4,1	638,6	1088,3
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	20,5	16,3	1,0	3,9	652,8	1062,8
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	17,2	17,3	1,0	4,1	669,8	1406,2
Média	19,3	17,3	1,1	4,1	624,3	1228,3
C.V. 1 (%)	29,1	16,5	16,5	24,6	25,8	24,7
C.V. 2 (%)	36,1	14,4	16,9	19,7	19,3	29,2

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. C.V.1: coeficiente de variação da parcela principal e C.V.2: coeficiente de variação da subparcela. *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*

DALOLIO et al., (2018), afirma que a utilização de bactérias na coinoculação com *Bradyrhizobium* estimula e promove o crescimento das plantas de soja. Isto porque, a aplicação do *B. japonicum* isolado ou em conjunto, além de favorecer a absorção de N por meio do processo de FBN, também estimula a produção de hormônios vegetais que beneficiam e favorecem o crescimento das plantas.

Além disso, são diversos os estudos comprovando a eficiência das bactérias do gênero *Azospirillum* em produzir fito-hormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas, ou estimular a produção endógena desses fito-hormônios (BOTTINI et al., 1989; MASCIARELLI et al., 2013), o que promove o alongamento das raízes, proporcionando maior área útil do sistema radicular para absorção de água e nutrientes, aumentando a resistência a seca e tornando as plantas mais vigorosas e produtivas (BRZEZINSKI et al.,

2014). Corroborando com os resultados de Bárbaro et al. (2009), os quais observaram em seu trabalho que, plantas de soja inoculadas com *A. brasilense* e *B. japonicum*, via semente, apresentaram sistemas radiculares mais desenvolvidos.

Ainda na tabela 4, é possível observar que nenhum tratamento e forma de aplicação afetou significativamente o sistema radicular das plantas de Candelária. Resultado este que pode estar associado à baixa eficiência da inoculação das bactérias decorrente da baixa umidade do solo no momento da semeadura, associada a acidez do solo deste local e de estresses por déficit hídrico em virtude da seca e falta de irrigação (Figura 1), diferenciando das condições encontradas em Santa Maria.

Em relação as trocas gasosas nas plantas de soja (Tabela 5), a taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (Gs) e a taxa de transpiração (E) não foram significativas com o uso da inoculação e coinoculação de microrganismos em folhas de soja aos 40 e 78 dias após a emergência (DAE).

Os resultados revelaram valores da transpiração foliar (E) aproximadamente constantes, independente dos fatores analisados aos 40 dias (Tabelas 5), o que presumivelmente ocorreu em função da ausência de limitação hídrica durante o período experimental neste local, uma vez que o ensaio foi irrigado, portanto, as plantas de soja expressaram a demanda máxima de transpiração. Bulegon et al. (2016) relataram que na cultura da soja a planta expressa a capacidade máxima de transpiração em condições adequadas de água.

Tabela 5. Taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (Gs), concentração intracelular de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) em folhas de soja aos 40 e 78 dias após a emergência (DAE), em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria, RS. Safra 2021/22.

Formas de aplicação	40 dias				
	A μmol m ⁻² s ⁻¹	Gs mmol m ⁻² s ⁻¹	Ci ppm	E mmol m ⁻² s ⁻¹	EUA μmol mol ⁻¹
Semente	25,2 ^{ns}	189,3 ^{ns}	151,3 ^{ns}	3,2 ^{ns}	7,8 ^{ns}
Sulco	24,5	187,9	156,9	3,2	7,6
Microrganismos					
Testemunha	24,0 ^{ns}	174,1 ^{ns}	144,8b	3,0 ^{ns}	8,0a
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	27,6	207,1	152,6b	3,3	8,3a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	22,4	153,1	134,5b	2,6	8,5a

<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	25,0	179,5	140,4b	3,2	7,9a
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	24,9	193,8	162,6a	3,4	7,1b
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	26,4	208,6	162,5a	3,4	7,6a
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	24,4	192,7	160,8a	3,2	7,5b
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	24,2	200,0	174,7a	3,6	6,7b
Média	24,9	188,6	154,1	3,2	7,7
C.V. 1 (%)	14,4	22,7	11,8	20,8	9,0
C.V. 2 (%)	18,7	21,8	9,0	18,8	7,0
78 dias					
Formas de aplicação	A	Gs	Ci	E	EUA
	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ppm	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
Semente	23,4 ^{ns}	186,8 ^{ns}	159,1b	3,2 ^{ns}	7,6 ^{ns}
Sulco	22,7	200,8	178,5a	3,5	6,9
Microrganismos					
Testemunha	22,9 ^{ns}	163,3 ^{ns}	137,3 ^{ns}	2,3b	10,1a
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	23,5	184,7	165,9	2,7b	8,7a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	22,4	202,2	174,3	3,6a	6,6b
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	20,2	151,8	154,9	2,9b	6,9b
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	25,7	229,7	179,9	4,0a	6,5b
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	24,9	222,7	180,5	4,3a	5,9b
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	24,3	221,7	181,1	4,1a	6,1b
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	20,5	184,7	186,3	3,4a	6,1b
Média	23,0	193,8	168,8	3,3	7,3
C.V. 1 (%)	17,7	24,9	17,5	21,4	16,4
C.V. 2 (%)	23,0	32,9	18,8	28,0	20,5

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. C.V.1: coeficiente de variação da parcela principal e C.V.2: coeficiente de variação da subparcela. *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*

Estes resultados divergem dos obtidos por Silva et al (2020), que mostraram aumento de 75% na taxa fotossintética de plantas de soja tratadas com *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., e Lima et al. (2022) que mostraram um aumento de 66,7% na eficiência fotoquímica de plantas de soja inoculadas com *Rhizobium* e, assim, demonstraram os benefícios nutricionais e bioquímicos advindos dos microrganismos.

Contudo, existem várias respostas para as alterações fisiológicas nas plantas, as quais variam sobretudo devido à ocorrência de estresses, a sua duração, à intensidade e à frequência em que ocorrem. Para Ferrari et al., (2015), em menor ou maior intensidade os estudos mostram que plantas submetidas a períodos de escassez de água reduzem o potencial hídrico foliar e a assimilação de carbono, e aumentam a eficiência do uso da água, corroborando com os resultados encontrados.

No entanto, esses microrganismos podem ter efeitos mais visíveis em outras variáveis

que afetam o desenvolvimento da planta com efeito na produtividade de grãos. De acordo com o trabalho de Nascente et al (2017), embora os microrganismos não tenham grande efeito nas trocas gasosas em relação ao tratamento testemunha, eles proporcionaram melhorias significativas na produtividade de grãos.

Outras avaliações que não obtiveram diferenças significativas neste trabalho na cidade de Santa Maria, foram os teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja no estágio fenológico R2, independente da forma de aplicação. No entanto, em Candelária houve incremento dos teores de N, P e K no tecido foliar (Tabela 6).

Em relação aos teores de N em Candelária, observa-se que quando realizada a inoculação da bactéria *Bradyrhizobium* e a sua coinoculação com os demais microrganismos, há aumento significativo dos teores de N, que pode ser justificado por meio da relação de simbiose com a planta de modo eficiente neste local. Estes valores se encontram na faixa considerada adequada para a cultura da soja (45 a 65 g kg⁻¹) (EMBRAPA, 2020), sendo o tratamento sem adição de bactérias, inferior aos valores de referência.

Entretanto em Santa Maria, por se tratar de uma área experimental mais consolidada e bem mais trabalhada no quesito fertilidade e correção do solo, é possível justificar esses teores menores, por haver uma maior disponibilidade inicial de N no solo, em virtude da decomposição da matéria orgânica remanescente dos cultivos anteriores, o que pode ocasionar na redução da nodulação e da eficiência da FBN (HUNGRIA et al., 2006).

Tabela 6. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar das plantas de soja no estágio fenológico R2 e produtividade de grãos em função da inoculação e coinoculação de microrganismos na semente e sulco de semeadura. Santa Maria e Candelária, RS. Safra 2021/22.

Formas de aplicação	Santa Maria			Produtividade de grãos (kg ha ⁻¹)
	N	P	K	
	----- g kg ⁻¹ -----			
Semente	36,3 ^{ns}	3,8 ^{ns}	15,0 ^{ns}	4810,2b
Sulco	35,9	3,8	14,6	5145,5a
Microrganismos				
Testemunha	35,6 ^{ns}	3,8 ^{ns}	14,9 ^{ns}	4201,1c
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	35,8	3,6	14,5	4949,0b
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	33,2	3,8	15,5	5764,1a
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	37,6	3,7	15,1	4976,3b
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	39,2	3,8	13,5	5010,3b
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	34,4	3,7	14,4	4746,6b

<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	36,9	3,9	15,8	4994,2b
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	35,9	4,2	14,7	5181,2b
Média	36,12	3,8	14,8	4977,8
C.V. 1 (%)	19,11	18,5	17,7	9,21
C.V. 2 (%)	18,77	14,1	12,0	12,21
Candelária				
Formas de aplicação	N	P	K	Produtividade de grãos
	----- g kg ⁻¹ -----			(kg ha ⁻¹)
Semente	44,7 ^{ns}	4,7 ^{ns}	14,9 ^{ns}	3850,7 ^{ns}
Sulco	45,6	4,9	15,7	3870,6
Microrganismos				
Testemunha	40,0b	3,2b	14,1b	3490,6b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	46,6a	5,4a	16,6a	4068,0a
<i>Bj + Azospirillum brasilense</i>	50,9a	5,9a	17,0a	4181,7a
<i>Bj + Trichoderma asperelloides</i>	46,9a	5,6a	13,8b	4071,3a
<i>Bj + Pseudomonas fluorescens</i>	48,1a	5,0a	17,0a	4065,1a
<i>Bj + Bacillus subtilis</i>	45,5a	4,0b	13,5b	3860,0a
<i>Bj + Bacillus amyloliquenfacies</i>	45,8a	4,5b	13,8b	3416,8b
<i>Bj + Bacillus megaterium</i>	41,3b	4,9a	16,6a	3731,8b
Média	45,1	4,8	15,3	3860,7
C.V. 1 (%)	10,9	22,2	17,4	11,2
C.V. 2 (%)	8,6	26,1	9,8	8,9

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. C.V.1: coeficiente de variação da parcela principal e C.V.2: coeficiente de variação da subparcela. *Bj*: *Bradyrhizobium japonicum*

Em relação aos valores de P considerados adequados no tecido vegetal da soja segundo a Embrapa (2020) estão entre 2,8 - 4,5 g kg⁻¹. E segundo os parâmetros mensurados no trabalho realizado por Kurihara et al. (2013), a suficiência do teor de P no tecido foliar considerado suficiente é entre teores de 2,8 e 3,3 g kg⁻¹. Valor inferior a 2,8 é considerado baixo, 3,4 a 3,9 alto e maiores que 3,9 considerados como excesso.

Portanto, os teores de P foliar da soja de Candelária (tabela 6), encontra-se com uma média de 4,8 g kg⁻¹, chegando a teores de 5,6 e 5,9 quando coinoculada com *A. brasilense* e *T. asperelloides* respectivamente. Ou seja, dentro dos valores recomendados como adequados pela Embrapa e considerados em excesso de P segundo Kurihara et al. (2013).

Logo, compreende-se que a coinoculação com algumas bactérias a depender do local e condições adequadas, pode possibilitar o aumento do teor de P no tecido foliar da soja, possivelmente, por meio da solubilização de fosfato proporcionando a sua suficiência para o desenvolvimento e crescimento das plantas. Obviamente, a interação entre plantas e microrganismos é complexa e quase ilimitada, o que tem se mostrado difícil de controlar e de

afirmar efeitos em experimentos de campo.

Em pesquisas de Mattos (2020), a agricultura moderna e sustentável preconiza o uso de microrganismos capazes que estabeleceram simbioses com plantas e supriram, pelo menos em parte, as exigências nutricionais da soja. Os microrganismos capazes de melhorar a disponibilidade de P às plantas tornam-se aliados nesse processo, uma vez que a disponibilidade de P está relacionada com processos de mineralização, geralmente atrelado a processos enzimáticos, como a atuação de fosfatases e fitases, e da solubilização de fosfatos por ácidos orgânicos.

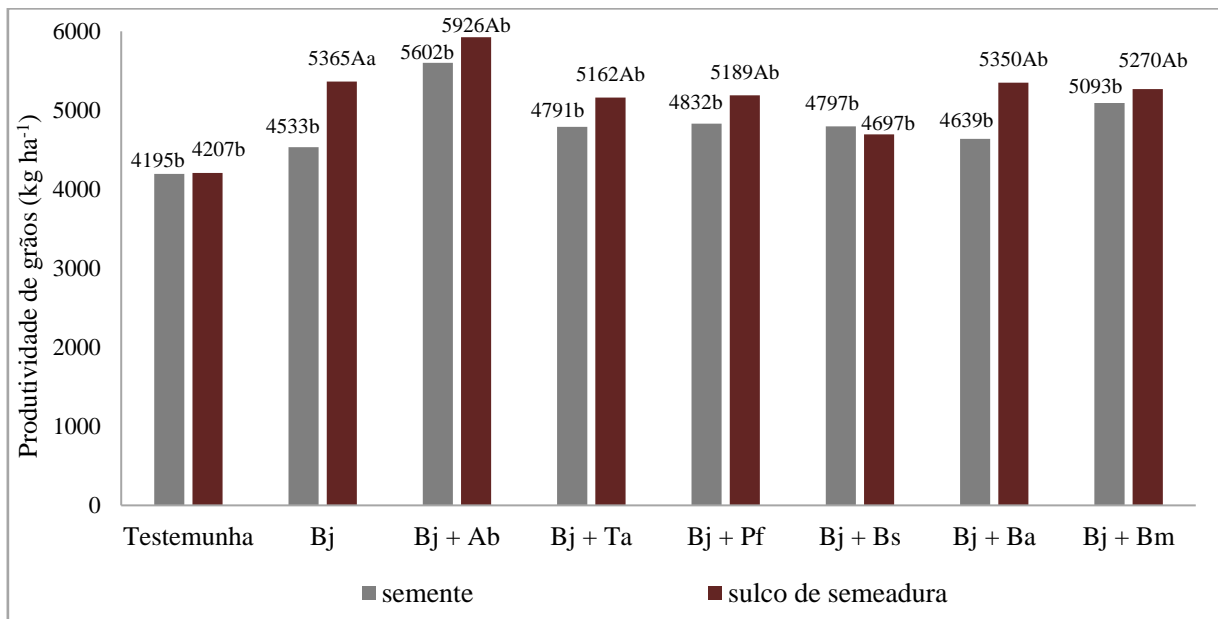
Quanto ao potássio, este encontra-se dentro da faixa recomendada pelo estudo realizado por Stammer e Mallarino (2018), os quais relatam que as faixas críticas para um maior rendimento da cultura são compreendidas entre 15,6 - 19,9 g kg⁻¹ de K. No presente estudo, a média para esse teor em função dos tratamentos com a utilização de microrganismos na inoculação e coinoculação da soja, foi de 15,3 g kg⁻¹, abaixo do limite inferior requerido para este nutriente, segundo esta faixa. Entretanto, apresenta tratamentos como a inoculação de *Bradyrhizobium* e a coinoculação com *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *B. megaterium* dentro da faixa ideal.

Ainda na Tabela 6, observa-se que para produtividade de grãos, houve interação entre as formas de aplicação (no sulco e na semente) e os microrganismos aplicados. Constatou-se, que a produtividade de grãos obteve diferenças significativas entre os fatores: formas de aplicação x microrganismos, e em relação ao local (Figura 5). Em Santa Maria, a produtividade média foi de 4.977,8 kg ha⁻¹, sendo a produtividade na forma de aplicação dos microrganismos no sulco superior, com média de 5.145,5 kg ha⁻¹, com um incremento significativo de 335,3 kg ha⁻¹ a mais de soja quando comparada a média da produtividade da aplicação feita via semente.

Além disso, destaca-se as respostas obtidas pela inoculação de *Bradyrhizobium* e a coinoculação com os demais microrganismos, os quais foram todos superiores, diferindo estatisticamente da testemunha (sem aplicação), principalmente a coinoculação com *Azospirillum*, sendo o tratamento de maior produtividade atingindo a média de 5.764 kg ha⁻¹. Em Candelária, também foi o tratamento com a maior média de produtividade (4.181,7 kg ha⁻¹), seguido da coinoculação com *Trichoderma* (4.071,3 kg ha⁻¹), médias estas superiores que a média geral de 3.860,7 kg ha⁻¹.

O desdobramento da interação significativa para a produtividade de grãos está apresentado na Figura 5, onde é possível analisar o detalhamento de cada resposta e observar o resultado superior da coinoculação com o *Azospirillum brasilense* no sulco.

Figura 5. Desdobramento da interação formas de aplicação versus microrganismos na produtividade de grãos (kg ha^{-1}) avaliada no experimento de Santa Maria, RS. Safra 2021/22.



Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Bj: *Bradyrhizobium japonicum*; Ab: *Azospirillum brasilense*; Ta: *Trichoderma asperelloides*; Pf: *Pseudomonas fluorescens*; Bs: *Bacillus subtilis*; Ba: *Bacillus amyloliquenfacies*; Bm: *Bacillus megaterium*.

Dessa forma, os melhores resultados obtidos neste trabalho no quesito produtividade se refere a aplicação via sulco de semeadura, estes podem estar relacionados às condições mais favoráveis para o estabelecimento do *Bradyrhizobium*, em termos de temperatura, umidade, fontes de carbono e estruturação do solo, decorrentes do não-revolvimento do solo e da cobertura proporcionada pelos resíduos vegetais na superfície, principalmente em Santa Maria. Nessa situação, o inoculante parece estar mais bem localizado para infectar as raízes da soja.

Salienta-se ainda que, em Candelária, as condições para desenvolvimento da população dos microrganismos no solo possivelmente são menos favoráveis que em Santa Maria, por exemplo, devido a maior acidez do solo, baixa fertilidade, estresse por déficit hídrico e por não ter sido irrigado, diferentemente de Santa Maria. Somando-se a isso o fato de as sementes serem tratadas quimicamente com inseticidas e fungicidas, o que pode dificultar a sobrevivência do rizóbio, indicando a necessidade de maiores doses de inoculantes ou de uma reinoculação, visando manter populações de rizóbio adequadas no solo.

Braga Júnior et al. (2021) relataram em seu trabalho, o efeito dos microrganismos nas plantas de soja, estes que resultaram em aumentos de produtividade de 26,6% e 15,4% nas safras 2015/16 e 2016/17; além de estimular o crescimento vegetal por meio da síntese do ácido indol acético (IAA) e da solubilização do fósforo não lábil.

Diante disso, é essencial garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e, conseqüentemente, é necessária a implementação de práticas agrícolas resilientes que aumentem a produção e a produtividade, ajudando a proteger, restaurar e conservar os serviços ecossistêmicos. Nesse sentido, a coinoculação de microrganismos multifuncionais, conforme demonstrado no presente estudo, é uma tecnologia que atua intrínseca e extrinsecamente nas plantas e proporciona aumento da produção e estabilidade do equilíbrio ecológico (REZENDE et al., 2021).

4. CONCLUSÕES

A inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* na soja é eficiente, contribuindo na estatura das plantas, taxa de cobertura do dossel vegetativo, no maior aporte do sistema radicular, nodulação e produtividade de grãos.

A utilização da técnica de coinoculação de microrganismos multifuncionais junto ao *B. japonicum* é benéfica, onde a bactéria *A. brasilense* apresenta potencial para incrementar o crescimento radicular das plantas e da produtividade de grãos.

A aplicação de microrganismos não influencia nos teores nutricionais dos tecidos vegetais.

A forma de aplicação de microrganismos em sulco de semeadura é mais produtiva e assertiva, nas condições de Santa Maria, favorecendo aumento na população inicial de plantas, taxa de cobertura do dossel vegetativo e produtividade de grãos.

REFERÊNCIAS

- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 45-47, 1989.
- BRAGA JÚNIOR, G. M. et al. Bacillus subtilis como inoculante promotor de crescimento em plantas de soja no campo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 107220-107237, 2021.
- BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 581-588, 2009.
- BRZEZINSKI, C. R. et al. Nitrogênio e inoculação com *Azospirillum* na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de trigo. **Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 3, p. 257-265, 2014.
- BULEGON L. G. et al. Growth and gas exchange in the vegetative period of soy inoculated with bacteria diazotrophic. **Nativa**, v. 4, p. 277–286, 2016.
- CARAFFA, M. et al. **Indicações Técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2018/2019 e 2019/2020**. 1. ed., v. 1, p. 105, 2018.
- CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35. 2009.
- CQFS - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS / SC. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2016. 376p.
- DALOLIO, R. S.; BORIN, E.; CRUZ, R. M. S.; ALBERTON, O. Co-inoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2018.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja**. Embrapa Soja, 2020. 347p.
- EMYGDIO, B. et al. **Cultivo de soja e milho em terras baixas do Rio Grande do Sul**, Embrapa, 2017, p. 341.
- FERRARI, E.; DA PAZ, A.; SILVA, A. C. DA. Déficit hídrico e altas temperaturas no metabolismo da soja em sementeiras antecipadas no Mato Grosso. **Nativa**. v. 3, n. 1, p. 67-77, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.
- HIRAKURI, M. H. **Perdas econômicas geradas por estresses bióticos e abióticos na produção brasileira de soja no período 2016-2020**. Circulat Técnica, 169 Londrina, PR,

2021.

HUNGRIA, M. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. *In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (ed.). Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity*. Houston: Studium, 2006. cap. 2, p. 43-93.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produto Interno Bruto - PIB 1º tri/2023**. 2023. Brasília.

KURIHARA, C.V. et al. Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em algodão e em soja, definidas em função de índices DRIS1. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p.412-419, 2013.

LIMA, A. F. S. et al. Eficiência fisiológica e desempenho do amendoim sob estresse salino e inoculado com *Bradyrhizobium*. **Water Resources and Irrigation Management**, v. 11, n. 1-3, p. 22-35, 2022.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Conceitos**. 2021. Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>.

MARCHIORI, L. F. et al. Desempenho vegetativo de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em épocas normal e safrinha. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 383-390. 1999.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.

MATTOS, J. V. **Efeito de bioestimulante via solo na nutrição e no rendimento de grãos de soja e trigo**. Dissertação de Mestrado em Uso e Manejo do Solo, Ponta Grossa. 2020.

MEYER, M. C. et al. **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2022, p. 550.

NASCENTE A. S. et al. Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. **Environmental Science and Pollution Research**. v.24, p. 2956–2965, 2017.

PATRIGNANI, A.; OCHSNER, T. E. Canopeo®: A powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. **Agronomy Journal**, v. 107, p. 2312–2320, 2015.

REZENDE, C. C. et al. Physiological and agronomic performance of common bean treated with multifunctional microorganisms. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, p. 1-9, 2021.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Embrapa, Brasília. 5ª ed. 2018.

SILVA, A. F. et al. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, p. 27, 2011.

SILVA, M. A. et al. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 619–632, 2020.

STAMMER, A. J.; MALLARINO, A. P. Plant tissue analysis to assess phosphorus and potassium nutritional status of corn and soybean. **Soil Science Society of America Journal**, v. 82, p. 260-270, 2018.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHMEN, H. **Análise de solo, plantas e outros minerais**. Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 174.

TOCHETO, G. H. G; BOIAGO, P. N. Formas de aplicação de *Rhizobium tropici* e *Azopilillum brasiliense* coinoculados na cultura do feijão. **Revista Cultivando o Saber**, v. 13, n. 2, p. 37-48, 2020.

VIERA NETO, S. A. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 861-870, 2008.

ZILLI, J. E. et al. Inoculação no sulco com *Bradyrhizobium* alternativamente à inoculação em sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1875-1881, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos experimentos realizados em casa de vegetação e a campo, percebe-se que a utilização da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e coinoculação desta bactéria com outros microrganismos multifuncionais trazem diversos benefícios para a cultura da soja. Entre estes, aumento na nodulação, massa seca de raízes, maior volume radicular, estatura de plantas, maior taxa de cobertura do dossel vegetativo e incrementos na produtividade de grãos.

Estes resultados nos indicam a eficácia da utilização dessas bactérias. Contudo, é imprescindível mais estudos a respeito da combinação de bactérias e outros microrganismos, das formas de aplicação destes, principalmente em virtude da variabilidade de local para local, associado a efeitos de temperatura, influência do pH, alumínio e matéria orgânica do solo, complexo de troca, dentre outras características químicas e físicas oriundas de cada solo, além da biodiversidade microbiana nativa já pré-existente.

O assunto de bioinsumos na cultura da soja ainda é considerado novo. Percebe-se através destes resultados e comparando com outros autores, que há uma complexidade da interação microrganismos, solo e planta, e mais ainda, quando é relacionado a ambiente de terras baixas. Desta forma, ainda se têm muitos desafios e são necessários mais estudos de maior duração para esclarecer a interação entre ambos, como também a viabilidade econômica, dentre outras relações.

ANEXO

Tabela 1. Cepas dos microrganismos utilizados nos experimentos.

MICRORGANISMO	CEPA
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CCT 4065 SEMIA 586
<i>Azospirillum brasilense</i>	CCT 8053 ATCC 29145
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCT 0595 ATCC 13525
<i>Bacillus subtilis</i>	CCT 3131 ATCC 6051
<i>Bacillus megaterium</i>	CBMAI 2222
<i>Bacillus pumilus</i>	CCT 2487 ATCC 14884
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CCT 7690 ATCC 23350
<i>Trichoderma asperelloides</i>	MMBF 94/17