

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CASSILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA COM RIZOBACTÉRIAS  
PARA AMENIZAR OS EFEITOS ADVERSOS DA DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA**

**ELIJANARA RAISSA DA SILVA**

CASSILÂNDIA – MS

Fevereiro/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CASSILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA COM RIZOBACTÉRIAS  
PARA AMENIZAR OS EFEITOS ADVERSOS DA DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA**

**ELIJANARA RAISSA DA SILVA**

Orientador: **Prof. Dr. Fábio Steiner**

Co-orientador: **Dr. Alan Mario Zuffo**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Cassilândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração Sustentabilidade na Agricultura.

CASSILÂNDIA – MS

Fevereiro/2018

S131i Silva, Elijanara Raissa

Inoculação das sementes de soja com rizobactérias para amenizar os efeitos adversos da deficiência hídrica/ Elijanara Raissa da Silva. Cassilândia, MS: UEMS, 2018.

ix, 48p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado) – Agronomia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Steiner

1. Glycine max 2. Bradyrhizobium japonicum 3. Azospirillum brasilense I. Título

CDD 23.ed. 633.34



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CASSILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE NA AGRICULTURA-  
PGAC



"INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA COM RIZOBACTÉRIAS PARA  
AMENIZAR OS EFEITOS ADVERSOS DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA"

Acadêmico(a): ELIJANARA RAISSA DA SILVA

Orientador(a): Dr. FÁBIO STEINER

APROVADO: 12/02/2018.

*Ileana P. de F. e Silva*

Prof.ª. Dra. Ileana Puertas de Freitas e Silva (UNIFEV)

*Tyago Zoz*

Prof. Dr. Tyago Zoz (UEMS)

*Alan Mario Zuffo*

Dr. Alan Mario Zuffo (UEMS)  
Coorientador

*Fábio Steiner*

Prof. Dr. Fábio Steiner (UEMS)  
Orientador

***“Sorri diante do futuro”.***

Salomão (Pv. 31:25)

Dedico a Jesus Cristo, meu grande amor, melhor e fiel amigo, por caminhar comigo e por todo amor dedicado.

Dedico a minha mãe Maria Aparecida da Silva França, por todo amor, educação, carinho, cuidado, dedicação, e cumplicidade.

Dedico a minha mãe Marlene Marques de Carvalho (*in memoriam*), por todo amor que me foi concedido em vida, por todos os ensinamentos, carinho e cuidado.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, “Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém. Romanos 11:36”. Obrigada por me amar, me ensinar, orientar, ser o meu melhor e mais fiel amigo, o melhor Pai. Obrigada por seu imenso amor, carinho e cuidado.

À minha mãe, Cidinha, por sonhar comigo, ser amiga, porto seguro, encorajadora nos momentos difíceis, orar pela minha vida, chorar e rir comigo mesmo distante. Por seu incansável apoio, seu imenso amor e cuidado, obrigada mãe, essa conquista também é sua.

Aos meus tios de coração Altamiro e Marleide, obrigada por serem tão generosos, amigos, companheiros, confidentes, por todas as orações, obrigada por me amarem e cuidarem e de mim mesmo distante. Muito obrigada!

À minha família de coração, que mesmo longe não deixaram de me apoiar, torceram por mim, se alegrarem com minhas conquistas, e por me receber de braços abertos a cada retorno para casa. À vocês Tia Izaura, Jeferson, Iza, Maria e Luis.

Aos meus amigos/irmãos, Juliana e Alison, mesmo distante não deixaram de me apoiar, torcer por mim, por todas risadas, conselhos e ajudas. Obrigada por serem mais que amigos, serem irmãos, pais e conselheiros.

Ao meu orientador, Fábio Steiner, pela orientação, paciência, conselhos, dedicação, conversas e ensinamentos ao longo do curso. Muito obrigada Professor!

A banca por aceitar o convite, e por todas as contribuições.

A Igreja Presbiteriana Independente de Cassilândia (IPI), obrigada por serem a extensão da minha família em Cassilândia-MS. Ao Pr. Giancarlo e a Damaris, obrigada por serem amigos, conselheiros, por me apoiarem e ouvirem, orientarem em momentos difíceis, pelo amor que me ofereceram como família e amigos. Aos ministérios o qual fiz parte: missões, infantil e de jovens. Obrigada pela caminhada, vocês foram instrumentos de Deus na minha caminhada, o que aprendi com vocês levarei para sempre. Obrigada por ser uma igreja para FORA.

Aos irmãos e amigos da IPI, Bruna, Thamara, Pedro, Ubiratan, Gabriela, Dalva, Nilva, Gilmar, Elizandréia, Silvio, Nicole, Carol, Camila, Neto, Tia Alceir, Katiane, Tia Eurides, Gabriel, Leonardo. Obrigada por estarem comigo em tantos momentos, pelas risadas, almoços de domingo, companhia, amizade dedicada. À vocês que sempre

alegravam meu dia, riam, oravam e choravam comigo. E mesmo sem entender me ouviam falar sobre plantas. Obrigada por me ajudarem a ser parecida com Cristo.

As minhas amigas Thalia e Reijane, pela convivência diária, por me ouvirem, me ajudarem, por dividir o cotidiano comigo e me ensinarem tantas coisas boas. Obrigada por serem pessoas tão maravilhosas.

Ao professor Flávio Binotti, obrigada por ser um amigo e conselheiro.

Aos meus professores da graduação que se tornaram amigos Coelho, Oalas, Oacy, Roberta e Janaíne. Por terem me incentivado, e visto um potencial que nem eu mesma enxergava. Obrigada por enxergarem além de uma aluna, mas por me inspirarem como profissional. Muito obrigada!

A minha amiga e “irmã gêmea”, Talita, obrigada por ser amiga, irmã e companheira, agradeço imensamente a Deus por sua vida. Obrigada por tudo!

Aos funcionários da UEMS-UUC pelo convívio, atendimento e auxílio na preparação dos experimentos.

Aos meus colegas da UEMS-UUC Caio, Verônica, Celi, Helder, Jardel, Solange, Alan, Aécio, Diego, Pedro, André, Julia, Fernando Moraes, Rita de Cássia, Abimael e Fernando Lourenço, pelo auxílio na condução dos experimentos, e pelos conhecimentos compartilhados.

À CAPES e PIBAP pela concessão das bolsas de Pós-Graduação.

À todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.

**Muito Obrigada!**



## SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>LISTA DE APÊNDICES .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS .....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>RESUMO GERAL.....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>2</b>    |
| <b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>   | <b>4</b>    |
| 1.1. Cultura da Soja .....  | 4           |
| 1.2. Deficiência Hídrica e o Desenvolvimento das Plantas.....   | 5           |
| 1.2.1 Efeito da deficiência hídrica na cultura da soja.....   | 7           |
| 1.3. Uso de Rizobactérias na Agricultura.....   | 9           |
| <b>CAPITULO 2. INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA COM RIZOBACTÉRIAS<br/>PARA AMENIZAR OS EFEITOS ADVERSOS DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA .....</b> | <b>18</b>   |
| 2.1 Introdução.....   | 20          |
| 2.2 Material e Métodos.....   | 21          |
| 2.2.1. Localização e Caracterização do Experimento.....   | 21          |
| 2.2.2. Delineamento Experimental e Tratamentos .....  | 22          |
| 2.2.3. Implantação e Condução do Experimento.....   | 23          |
| 2.2.4. Análises Estatísticas .....  | 26          |
| 2.3. Resultados e Discussão.....  | 27          |
| 2.3.1. Avaliações Durante o Período de Imposição da Restrição Hídrica.....  | 27          |
| 2.3.1.1. Conteúdo relativo de água das folhas.....  | 27          |
| 2.3.1.2. Tolerância protoplasmática (Liberação de eletrólitos).....   | 29          |
| 2.3.2. Avaliações Após o Período de Imposição da Restrição Hídrica .....  | 30          |
| 2.3.2.1. Nodulação radicular da soja .....  | 31          |
| 2.3.2.2. Crescimento e produção de biomassa seca das plantas.....   | 33          |
| 2.4. Conclusões.....  | 38          |
| 2.5 Referências Bibliográficas.....   | 38          |
| <b>APÊNDICES .....</b>  | <b>45</b>   |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Propriedades químicas do solo arenoso utilizado no experimento. UEMS/Cassilândia- MS, 2017 ..... 22
- Tabela 2.** Resumo das análises de variância para o conteúdo relativo de água das folhas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615 RR] durante o período de 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS/Cassilândia, 2017 ..... 27
- Tabela 3.** Efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica no conteúdo relativo de água das folhas (CRA) de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] no “pre down” durante os 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS, Cassilândia-MS, 2017 ..... 28
- Tabela 4.** Efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica na porcentagem de dano das membranas celulares das folhas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS, Cassilândia-MS, 2017..... 29
- Tabela 5.** Análises de variância para as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (BSN), altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de vagens (NV), área foliar (AF), volume radicular (VR), biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de vagens (BSV), biomassa seca do caule (BSC), biomassa seca das raízes (BSR), biomassa seca da parte aérea (BSPA), e biomassa seca total (BST), das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615 RR] em função dos fatores inoculação das sementes e nível de restrição hídrica. UEMS/Cassilândia, 2017..... 31
- Tabela 6.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica no número de nódulos e na biomassa seca dos nódulos por planta de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas aos diferentes níveis de deficiência. UEMS, Cassilândia-MS, 2017..... 31
- Tabela 7.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência

hídrica na altura de planta, diâmetro do caule, número de folhas trifolioladas, número de vagens, área foliar e no volume radicular das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica. UEMS, Cassilândia-MS, 2017.....33

**Tabela 8.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica na biomassa seca das folhas (BSF), do caule (BSC), das estruturas reprodutivas (BSER), das raízes (BSR), da parte aérea (BSPA) e biomassa seca total (BST) plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica. UEMS, Cassilândia-MS, 2017.37

**LISTA DE APÊNDICES**

- Apêndice 1.** Detalhe da operação de semeadura do cultivar de soja 5D615 RR (nos vasos plásticos de 12 L. Foram semeadas 8 sementes por vasos e após o desbaste foram deixadas duas plantas. UEMS/Cassilândia, 2017.....46
- Apêndice 2.** Ilustração das operações para a coleta dos discos foliares de soja cv. 5D615 RR, as avaliações foram realizadas entre as 4:30 e 5:30 horas da manhã (pre-dawn). UEMS/Cassilândia, 2017. ....46
- Apêndice 3.** Ilustração dos discos foliares acondicionados em placas de petry com água destilada para a obtenção da massa turgida, após 6 hs de imersão. UEMS/Cassilândia, 2017. ....47
- Apêndice 4.** Visão geral do experimento dentro da casa-de-vegetação climatizada. UEMS/Cassilândia, 2017. ....47
- Apêndice 5.** Detalhe do crescimento das plantas de soja cv. 5D 615 RR cultivada com 100% (controle), 50% (estresse moderado) e 25% (estresse severo) da capacidade de retenção de água do solo por 18 dias. UEMS/Cassilândia, 2017. ....48

**LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS**

|      |   |
|------|---|
| AF   | rea foliar                               |
| AP   | Altura de planta                          |
| CL   | Condutividade Livre                       |
| CRA  | Conteúdo Relativo de gua                 |
| CT   | Condutividade Total                       |
| CV   | Coefficiente de Variação                  |
| DBC  | Delineamento em Blocos Casualizados       |
| DC   | Diâmetro do caule                         |
| DM   | Dano de membrana                          |
| EROs | Especies reativas de oxignio             |
| FBN  | Fixação Biológica de Nitrogênio           |
| BF   | Biomassa fresca                           |
| BS   | Biomassa seca                             |
| BSC  | Biomassa seca do caule                    |
| BSER | Biomassa seca das estruturas reprodutivas |
| BSF  | Biomassa seca das folhas                  |
| BSPA | Biomassa seca da parte aérea              |
| BSR  | Biomassa seca das raízes                  |
| BST  | Biomassa seca total                       |
| BSV  | Biomassa Seca das Vagens                  |
| MT   | Massa Trgida                             |
| N    | Nitrogênio                                |
| NF   | Número de folhas                          |
| NV   | Número de vagens                          |
| PD   | Porcentagem de Dano                       |
| VR   | Volume radicular                          |
| C   | Graus celsius                             |
| %    | Porcentagem                               |

## RESUMO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de soja do mundo, no entanto, apesar desse cenário favorável a ocorrência de deficiência hídrica ainda é um fator de risco e de insucesso no cultivo. O uso de rizobactérias podem atenuar os efeitos prejudiciais da deficiência hídrica no crescimento das plantas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada no crescimento e na indução da tolerância das plantas de soja submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 12 L preenchidos com solo arenoso e mantidas em casa-de-vegetação climatizada a 26 °C ( $\pm 2$  °C). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial  $3 \times 4$  com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de três níveis de regime hídrico [100% da capacidade de retenção de água do solo (controle), 50% do controle (estresse moderado) e 25% do controle (estresse severo)] e de quatro tratamentos de inoculação das sementes: i) controle (sem inoculação); ii) inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; iii) inoculação com *Azospirillum brasilense*; e, iv) coinoculação com *B. japonicum* + *A. brasilense*. Durante a restrição hídrica foram mensurados o conteúdo relativo de água das folhas e a tolerância protoplasmática. Após o período de restrição hídrica foram determinadas as variáveis de nodulação (número de nódulos e biomassa seca de nódulos), crescimento (altura de planta, diâmetro do caule, número de folhas, número de vagens, área foliar e volume radicular), e produção de biomassa seca (folhas, vagens, caule, raízes, parte aérea e biomassa seca total). Os resultados evidenciaram que a inoculação isolada de *A. brasiliense* não aliviou os efeitos negativos da deficiência hídrica. A inoculação das sementes de soja com *B. japonicum* e *A. brasiliense* de forma isolada ou combinada não interferiu no CRA das plantas de soja sob condições de deficiência hídrica. A inoculação com *B. japonicum* se mostrou eficiente para a altura de plantas, número de vagens e biomassa seca das vagens, enquanto que em condições de deficiência hídrica moderada a inoculação com *B. japonicum* se mostrou eficiente para a nodulação em plantas de soja.

---

**Palavras chave:** *Glycine max* (L.) Merrill., *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, seca.

SEED INOCULATION WITH RHIZOBACTERIA TO AMELIORATE THE ADVERSE EFFECTS OF WATER DEFICIENCY IN SOYBEAN. Cassilândia, 2018. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Sustentabilidade na Agricultura) – Unidade Universitária de Cassilândia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Author: ELIJANARA RAISSA DA SILVA

Adviser: FÁBIO STEINER

### ABSTRACT

Brazil is one of the largest producers and exporters of soybeans in the world, however, despite this favorable scenario, the occurrence of water deficiency is still a risk factor and crop failure. The use of rhizobacteria can attenuate the negative effects of drought on plant growth. The objective of the present study was to evaluate the effects of inoculation of the seeds with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* alone or in combination on the plant growth and tolerance induction of soybean plants submitted to different water deficiency levels. The plants were grown in 12-L plastic pots filled with sandy soil and kept in a greenhouse at 26 °C. The experimental design was a randomized complete block design in a 3 × 4 factorial schemes with four replications. The treatments consisted of three water regime levels (100% of the water retention capacity of the soil (control), 50% of the control (moderate stress) and 25% of the control (severe stress)] and four treatments of inoculation of the seeds: i) control (without inoculation); ii) inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*; iii) inoculation with *Azospirillum brasilense*; and, iv) co-inoculation with *B. japonicum* + *A. brasilense*. During the water restriction the relative water content of the leaves and the protoplasmic tolerance were measured. After the period of water restriction, the nodulation (number of nodules and dry biomass of nodules), growth (plant height, stem diameter, number of leaves, number of pods, leaf area and root volume) of dry biomass (leaves, pods, stems, roots, shoots and total dry biomass) were measured. The results showed that the isolated inoculation of *A. brasiliense* did not alleviate the negative effects of water deficiency. Inoculation of soybean seeds with *B. japonicum* and *A. brasiliense* alone or in combination did not interfere with the CRA of soybean plants under water deficit conditions. The inoculation with *B. japonicum* proved to be efficient for plant height, number of pods and pod dry biomass, whereas under moderate water stress inoculation with *B. japonicum* proved to be efficient for nodulation in soybean plants.

---

**Key words:** *Glycine max* (L.) Merrill., *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, drouht.



## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. Cultura da Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] é uma planta leguminosa, herbácea, de ciclo anual, originária da região Leste da Ásia, pertencente à família Fabaceae. É uma das mais importantes culturas oleaginosas do mundo, por ser uma excelente fonte de proteína e óleo vegetal (SEDIYAMA et al., 2015). O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, superado apenas pelos Estados Unidos da América (EUA). Na safra 2016/2017, a cultura ocupou uma área de 33,9 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 113,9 milhões de toneladas (CONAB, 2017). A produtividade média da soja brasileira foi de 3.360 kg ha<sup>-1</sup>. Os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, são os principais produtores nacionais de soja, estes três estados são responsáveis por cerca de 60% de toda produção nacional de soja (CONAB, 2017). O estado do Mato Grosso do Sul é o quinto maior produtor nacional de soja, com uma produção de 8,5 milhões de toneladas, correspondendo a 7,5% da produção nacional (CONAB, 2017).

Nos últimos anos, a soja se destacou como a cultura agrícola com maior extensão de área cultivada e a principal responsável pela expansão da fronteira agrícola brasileira, principalmente, para as regiões Centro-Oeste e Norte (SEDIYAMA et al., 2015). O expressivo crescimento da sojicultura deve-se em grande parte, a cultivares adaptados as diferentes condições climáticas, o mercado de *commodity*, e o investimento em soluções tecnológicas que nutrem o agricultor (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2014).

Apesar do cenário favorável para a cultura da soja no Brasil, a ocorrência de adversidades climáticas ainda é um fator de risco e de insucesso no cultivo da soja. Dentre estas adversidades climáticas, a deficiência hídrica tem sido apontada como um dos principais fatores que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas e a produtividade da cultura da soja. Em algumas regiões ocorrem os veranicos interrompendo as chuvas por um período, assim, a falta de umidade e a elevação da temperatura podem afetar a floração e o enchimento de grãos, ocasionado pela restrição hídrica (GARCIA et al., 2007). Na região Centro-Oeste do Brasil, a ocorrência de restrição hídrica é frequente, podendo coincidir com os primeiros estádios vegetativos da cultura da soja, levando a perdas de produtividade. Portanto, estudos que visam buscar estratégias de manejo que minimizam os efeitos deletérios da seca despontam como de grande interesse para pesquisa agrícola.

## 1.2. Deficiência Hídrica e o Desenvolvimento das Plantas

A disponibilidade de água durante o crescimento das plantas tem sido uma das principais limitações de produtividade das safras nas últimas décadas, e as mudanças climáticas globais certamente podem contribuir para que a falta de água se torne um fator ambiental de restrição ainda maior para a produção agrícola em diversas regiões (CHAVES et al., 2003; ALMESELMANI et al., 2011; ZLATEV e LIDON, 2012).

A essencialidade da água para as plantas vem da sua contribuição na manutenção e na preservação das funções vitais; e representa de 80 e 95% da biomassa fresca de uma planta, atuando em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos. Desempenha a função de solvente, por meio do qual, gases, minerais e outros solutos entram nas células e movem-se na planta. Tem ainda, papel importante na regulação térmica da planta, atuando tanto no resfriamento como na manutenção e na distribuição do calor (GUIMARÃES e STONE, 2008; TAIZ et al., 2017).

Portanto, a caracterização dos mecanismos e/ou processos envolvidos na inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas pela deficiência hídrica constitui um problema de importância e real interesse. Os efeitos da deficiência hídrica são variáveis em função da sua intensidade (duração da restrição hídrica: veranico ou seca prolongada), da velocidade de exposição do estresse, e do estágio de desenvolvimento da planta em que a restrição hídrica ocorre (PIMENTEL, 2004).

A frequência e a intensidade da deficiência hídrica constituem os fatores mais importantes à limitação da produção agrícola mundial. De acordo com Ortolani e Camargo (1987), sem considerar os efeitos extremos, esta limitação é responsável por cerca de 60 a 70% da variabilidade da produção agrícola, razão por que no planejamento da agricultura irrigada, é de fundamental importância o conhecimento das condições meteorológicas durante o período de desenvolvimento das plantas, principalmente, quanto aos períodos de baixa precipitação e elevada evapotranspiração. Na agricultura de sequeiro, entretanto, a prioridade é associar a época de semeadura ao período mais adequado de disponibilidade de água às plantas, principalmente em regiões de baixas latitudes.

A deficiência hídrica provoca redução na taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  (fotossíntese), área foliar, taxa de transpiração e taxa de crescimento das plantas (GAO et al., 2006; KRON et al., 2008). Estes efeitos, em geral, podem ser parcialmente explicados por uma baixa concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  devido ao fechamento estomático (CHAVES et al., 2002). A deficiência hídrica também pode modificar a atividades das enzimas envolvidas

no metabolismo do carbono e do nitrogênio e alterar os níveis de antioxidantes (GONG et al., 2005; FLEXAS et al., 2006; GUNES et al., 2008; ZOZ et al., 2013). Algumas destas respostas fazem parte de estratégias que visam à redução dos efeitos deletérios da seca, constituindo, portanto, em mecanismos de tolerância das plantas à seca.

De acordo com Taiz et al. (2017), existem três linhas de defesa contra a seca. A redução da área foliar pode ser considerada a primeira. A inibição da expansão foliar resulta na redução da velocidade de expansão foliar com o início da deficiência hídrica, então, se a área foliar for menor, a planta transpira menos, conservando, efetivamente, um suprimento de água limitado no solo por um período mais longo. Com o avanço da deficiência hídrica, as camadas superiores do solo são, em geral, as primeiras a secar. Logo, o crescimento de raízes mais profundas em direção ao solo úmido pode ser considerado uma segunda linha de defesa contra a seca. Sob condições, em que o começo do estresse é mais rápido ou a planta alcançou sua área foliar plena antes de iniciar o estresse por restrição hídrica, o estômato fechado reduz a transpiração. Assim o fechamento estomático pode ser considerado uma terceira linha de defesa contra a seca.

Existem duas estratégias básicas pelas quais as plantas resistem à seca: o “evitamento” e a tolerância à desidratação (LEVIT, 1972). Características de “evitamento” à desidratação atuam na manutenção do conteúdo relativo de água (CRA) em tecidos durante o período de deficiência hídrica. As plantas evitam a seca através do fechamento dos estômatos, aprofundamento das raízes para extração de água, redução do tamanho das células, espessamento das paredes celulares, aumento da cerosidade da cutícula, dentre outros. Por sua vez, as plantas que contêm a estratégia de “tolerância” apresentam tecidos que podem tolerar a desidratação, até certo ponto (baixo conteúdo relativo de água crítico) e, frequentemente, apresentam ajustamento osmótico e a tolerância protoplasmática à desidratação. A estratégia de tolerância permite às plantas manter a atividade metabólica com a evolução da restrição hídrica e declínio do CRA (LAWN e LIKOSWE, 2008). Por exemplo, a cultura da soja apresenta tanto características de “evitamento” como de “tolerância” à desidratação (SINCLAIR e LUDLOW, 1986).

A perda de turgescência é o efeito biofísico significativo que se manifesta mais cedo com a ocorrência da restrição hídrica, portanto, atividades dependentes da turgescência são as mais sensíveis à seca (TAIZ et al., 2017). A expansão celular é um processo dirigido pela turgescência e é extremamente sensível a deficiência hídrica. De acordo com Pimentel (2004), com a restrição mais severa da água, o potencial de turgescência da folha se anula paralisando, além da expansão foliar, a biossíntese de proteínas e a atividade de enzimas

como a nitrato redutase, sacarose fosfato sintetase e invertase ácida. A queda na síntese de proteínas, juntamente com a redução da relação proteína/aminoácido, ocorre principalmente devido à degradação de enzimas de lise e, posteriormente, a proteólise (CASTRILLO et al., 1990). Com a diminuição da taxa fotossintética, a síntese e acúmulo de amido fica prejudicada; além disso, acúmulo de açúcares solúveis nas células também pode ser observado como efeito do aumento da atividade da amilase em plantas expostas à deficiência hídrica (PIMENTEL, 2004).

Fumis e Pedras (2002) constataram que o acúmulo de prolina, juntamente com as poliaminas tem sido associado com a tolerância das plantas às condições de deficiência hídrica, podendo representar mecanismo regulador de perda de água, mediante a redução do potencial osmótico celular e a um possível ajuste osmótico. Outro fato a ser destacado é que estes compostos de menor massa molecular são rapidamente utilizados como “esqueletos de carbono” em uma reidratação da planta e retomada da atividade metabólica (HSIAO, 1973).

Quando plantas submetidas à deficiência hídrica atingem um estágio elevado de desidratação, com condutância estomática mínima e transpiração quase cuticular (PIMENTEL, 2004), começam a ocorrer efeitos irreversíveis na estrutura das membranas celulares, devido às alterações na composição e integridade das mesmas, causadas em parte, pelo aumento da atividade de lipases, proteases e formas ativas de oxigênio no citoplasma (ROY-MACAULEY et al., 1992). Uma das consequências desse e de outros fenômenos, que ocorrem mais acentuadamente neste elevado estágio de desidratação, é o aumento da permeabilidade celular e saída de íons da célula – extravasamento de eletrólitos (DEXTER et al., 1932). Segundo Pimentel (2004), nesta fase de desidratação ocorre a descompartimentalização das organelas celulares e a paralisação dos processos fisiológicos, como a fotossíntese e a respiração, não havendo mais possibilidade de recuperação.

### **1.2.1 Efeito da deficiência hídrica na cultura da soja**

A disponibilidade de água no solo influencia diretamente o crescimento e o desenvolvimento da soja no campo. Em condições climáticas desfavoráveis, com altas temperaturas e baixa disponibilidade de água no solo, o desenvolvimento das plantas de soja é retardado, ou em extremo caso, é inibido (FARIAS et al., 2007). A quantidade de água disponível no solo para as plantas está diretamente ligada à quantidade e à distribuição das chuvas e à capacidade do solo de reter a água (PIMENTEL, 2004). A deficiência hídrica é

definida como a falta de água acessível à planta, o que resulta em modificações fisiológicas, químicas e bioquímicas no metabolismo das plantas (BORRMANN, 2009).

A cultura da soja é, particularmente, suscetível à deficiência hídrica durante a fase de estabelecimento das plantas e nas fases de florescimento e enchimento dos grãos, podendo ocorrer perdas significativas de produção, dependendo da duração e intensidade da falta de água (DOSS e THURLOW, 1974; CÂMARA e HEIFFIG, 2000). No entanto, segundo Kron et al. (2008), plantas de soja submetidas à deficiência hídrica durante a fase de desenvolvimento vegetativo (estádio fenológico V<sub>4</sub>) podem ter sua tolerância aumentada em razão da falta de água em estádios posteriores.

Casagrande et al. (2001) complementaram que a ocorrência de deficiência hídrica durante as fases de germinação e emergência diminui o estande de plantas. No florescimento, causa abortamento de flores e impede a antese, enquanto que na fase de enchimento dos grãos, afeta o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, a produtividade.

Em plantas de soja submetidas à deficiência hídrica durante a fase de enchimento dos grãos, os mesmos são reduzidos tanto em massa e como em tamanho (NOGUEIRA e NAGAI, 1988). No entanto, é importante ressaltar que os grãos pequenos não necessariamente são resultados da restrição hídrica, mas sim, que existem cultivares que naturalmente produzem grãos menores. Uma resposta comum à restrição hídrica é a retenção da cor verde nos grãos (BORRMANN, 2009). A falta de água prejudica a atividade de enzimas responsáveis pela degradação da clorofila, o que resulta em alto teor de grãos verdes (ADAMS et al., 1983).

Estudos avaliando o efeito da deficiência hídrica em diferentes estádios de desenvolvimento em soja reportaram que, plantas submetidas à seca durante os estádios de pré-florescimento e florescimento pleno produzem menor quantidade de flores, vagens e sementes devido ao encurtamento desses estádios e ao abortamento de algumas flores (SIONIT e KRAMER 1976, MONEM et al., 1979; AHMED, 1984). Firmano et al. (2009) constataram que plantas de soja submetidas à deficiência hídrica logo após o estágio vegetativo V<sub>1</sub> (1º par de folhas totalmente expandidas) apresentaram menor biomassa seca da parte aérea, das raízes e das vagens.

De acordo com Taiz et al. (2017), para alcançar elevadas produtividades é importante considerar dois aspectos para o adequado desenvolvimento das plantas: a existência de água disponível no solo e a distribuição do sistema radicular ao longo do perfil do solo. No entanto, deve-se considerar que a quantidade de água disponível no solo é tanto maior quanto mais profunda a camada considerada. Assim, uma forma de aumentar a disponibilidade de água para as plantas é procurar conduzir o sistema radicular para essas camadas. Para um bom

desenvolvimento e aprofundamento das raízes, é preciso que o solo não tenha impedimentos físicos e, ou, químicos que dificultem o crescimento (MENGEL e KYRKBY, 2001).

### 1.3. Uso de Rizobactérias na Agricultura

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal colonizam a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos de diversas espécies vegetais, promovendo o crescimento das raízes e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes, além de auxiliar na tolerância à deficiência hídrica (KLOPPER et al., 1989; BASHAN et al., 2004). As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em diferentes espécies vegetais, incluindo diferentes representantes da família Poacea, tais como arroz, milho e cana-de-açúcar. As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de realizar a conversão enzimática do  $N_2$  a formas acessíveis aos demais eucariotos, possuindo um grande potencial em aumentar a biomassa através da redução de  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) e da excreção de substâncias promotoras de crescimento de plantas (PCPs) (BHATTACHARJEE et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Segundo Evans e Burris, (1992) os diazotróficos simbióticos estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e micro simbionte, e em alguns casos, são formadores de estruturas diferenciadas denominadas nódulos. A nodulação ocorre através do processo de infecção, em que algumas espécies leguminosas possuem especificidade hospedeira, pode ocorrer através de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, sua ocorrência se dá dentro da célula vegetal (REIS et al., 2006).

Técnicas biotecnológicas têm sido empregadas na agricultura moderna para melhorar o desempenho das plantas nos diferentes ambientes de cultivo, especialmente em condições de restrição hídrica. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos nas áreas de genética e biotecnologia agrícola tem sido constatado aumento significativo do uso de microrganismos na agricultura (SINGH et al., 2011). Estas bactérias encontradas na região da rizosfera são classificadas como rizobactérias e podem promover o crescimento das plantas por diversos mecanismos de interação, por exemplo, aumentando a tolerância das plantas à seca (BASHAN e BASHAN, 2005).

A inoculação com *A. brasilense* em sementes, atuando como rizobactéria promotora do crescimento de planta (RPCP), tem proporcionado resultados positivos em diversos estudos, atuando na promoção do crescimento vegetal, no nitrogênio total biologicamente fixado, e no rendimento de grãos (BÁRBARO et al., 2009; HUNGRIA et al., 2013), qualificando esta espécie bacteriana como de grande potencial para uso na agricultura. Essa RPCP pode estimular o crescimento das plantas de soja por diversas maneiras, sendo as mais

relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO et al., 2008); aumento na atividade da nitrato redutase quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN et al., 2008); produção de fitohormônios como auxinas, citocininas (CROZIER et al., 1988; CACCIARI et al., 1989), giberilinas (BOTTINI et al., 1989), etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e uma variedade de outras moléculas (PERRIG et al., 2007); solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004; INAGAKI et al., 2014); e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008). Em geral, tem sido relatado que as RPCP beneficiam o crescimento das plantas e a produtividade das culturas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003).

Considerando os efeitos benéficos das rizobactérias *A. brasilense* no crescimento das plantas, iniciou-se, nos últimos anos, os estudos com coinoculação de *B. japonicum* em combinação com *A. brasilense* em plantas leguminosas, como a soja, buscando ganho em nodulação e suprimento de nitrogênio, resultando em maior produção da planta (HUNGRIA et al., 2013). A tecnologia de coinoculação em leguminosas consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, os quais produzem efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos quando utilizados na forma isolada (BÁRBARO et al., 2009; HUNGRIA et al., 2013). Nos casos em que se tem utilizado *A. brasilense* em leguminosas, o efeito benéfico da associação com o *B. japonicum* se deve, na maior parte, a capacidade que a rizobactéria tem de produzir fitohormônios, que resulta em maior crescimento do sistema radicular, e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (BÁRBARO et al., 2009; CASSÁN et al., 2009; BULEGON et al., 2014), o que pode aumentar a tolerância das plantas à seca. No entanto, apesar de relatos dos efeitos benéficos da coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* na produtividade da cultura da soja, os relatos dos efeitos da coinoculação, destas rizobactérias na indução da tolerância das plantas de soja à deficiência hídrica são limitados (FERLINI, 2006; HUNGRIA et al., 2013; LIBÓRIO et al., 2015).

Schneider et al. (2017) avaliando o efeito da coinoculação das sementes de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando aumentar o rendimento da cultura, reportaram que a coinoculação resultou no aumento do rendimento de grãos de até 13,3% em relação ao tratamento não inoculado. Além disso, estes autores constataram correlação significativa entre as doses de inoculantes aplicados e os teores de N e o índice relativo de clorofila das folhas de soja. Oliveira et al. (2017) observando o efeito de diferentes fontes de fertilizantes e da inoculação das sementes com *B. japonicum* na produção de biomassa seca das plantas de soja,

relatam que a inoculação com *B. japonicum* não proporcionou efeito significativo para a produção de biomassa seca da parte aérea, das raízes, e para a nodulação das raízes de soja.

#### 1.4. Referências bibliográficas

ADAMS, O. A.; FJERSTAD, M. C.; RINNE, R. W. Characteristics of soybean seed maturation necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 02, p. 265-267, 1983.

AHMED, M. F. M. Water stress effects on physiological processes and yield of soybeans. **Science and Engineering**, v. 45, p. 1078-83, 1984.

ALMESELMANI, M.; ABDULLAH, F.; HARERI, F.; NAAESAN, M.; AMMAR, M. A.; KANBAR, O. Z.; SAUD, A. A. Effect of drought on different physiological characters and yield component in different varieties of syrian durum wheat. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 3, n. 3, p. 127 - 133, 2011.

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

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. **Plant Growth-Promoting**. In: HILLEL, D. In Encyclopedia of Soils in the Environment. 1.ed. Oxford: Elsevier, 2005. p.103-115.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**. Canadá, v. 43, p. 103-121, 2004.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BORRMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características e bioquímicas de soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólicos incolores**. 2009. 107 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, 2009.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BULEGON, L. G., KLEIN, J., RAMPIM, L., GUIMARÃES, V. F., BATTISTUS, A. G., KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, p. 26-37, 2014.



CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, p. 151-153, 1989.

CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. Fisiologia, ambiente e rendimento da cultura da soja. In: CÂMARA, G. M. DE S. (Ed.) **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2000. p. 450.

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 168-184, 2001.

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

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; SALAMONE, I. G. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CASTRILHO, M.; FERNANDEZ, D.; FERANANDEZ, P.; MOLINA, B.; KAZANDJIAN, A. Metabolismo del nitrogenio em *Phaseolus vulgaris* L. bajo deficit hidrico. **Turrialba**, v. 40, p. 515-519, 1990.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with stress in the field: photosynthesis and growth. **Annal Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHAVES, M. M; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 3, p. 239–264, 2003.

CONAB. Companhia Nacional de Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos: V. 4 - SAFRA 2016/2017- **9º Levantamento junho 2017**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 05 de maio de 2017.

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense* - plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008, p.87-95.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum*

*lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833–2837, 1988.

DEXTER, S. T.; TOTTENHAM, W. E.; GRABER, L. F. Investigations of the hardness of plants by measurement of electrical conductivity. **Plant Physiology**, v.7, n. p.63-78, 1932.

DIMKPA, C. O.; MERTEN, D.; SVATOS, A.; BÜCHEL, G.; KOTHE, E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1687–1696, 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

DOSS, B. D.; THULOW, D. L. irrigation, row width and plant population in relation to growth characteristics of two soybean varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v. 65, p. 620-623, 1974.

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. **Biological Nitrogen Fixation**: New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa, 9p. (Circular Técnica n° 48), 2007.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos – Agricultura**. 2006. Disponível em: <<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>>. Acessado em: 14 mar. 2017.

FIRMANO, R. S.; KUWAHARA, F. A. e SOUZA, G. M. Relação entre adubação fosfatada e deficiência hídrica em soja. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1967-1973, 2009.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist Journal**, v. 172, n. 73-82, 2006.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 449-453, 2002.

GAO, X.; ZOU, C.; WANG, L.; ZHANG, F. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. **Journal Plant Nutrition**, v. 29, p. 1637-1647, 2006.

GARCIA, A.; PÍPOLO, A.E.; LOPES, I. O.; PORTUGAL, F. A. F. **Instalação da lavoura de soja: época, cultivares, espaçamento e população de plantas**. Londrina- PR: Embrapa Soja, 2007. 12p. (Circular Técnica 51).

GONG, H.; ZHU, X.; CHEN, K.; WANG, S.; ZHANG, C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science**, v. 169, p. 313-321, 2005.

GUIMARÃES, C.M.; STONE, L.F. **Métodos de avaliação das condições hídricas das plantas**. Comunicado Técnico 161, Embrapa Arroz e feijão, 2008.

GUNES, A.; PILBEAM, D. J.; INAL, A.; COBAN, S. Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress. I: Growth, antioxidant mechanisms, and peroxidation and lipid peroxidation. **Communication Soil Science and Plant Analysis**, v. 39, p. 1885-1903, 2008.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja (Documentos Embrapa 349). 2014. 37p.

HSIAO, T. C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.519-570, 1973.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Efeitos da co-inoculação. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 170, n. 1, p. 40-41, 2013.

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

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; SILVA, M. B.; DIAMANTE, M. S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T. M.; DUARTE JÚNIOR, J. B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 48, p. 3480-3487, 2014.

KLOEPPER, J. W. Comparative analysis of methods for recovering plant growth promoting rhizobacteria from roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 953-957, 1991.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, n.1, p.39-44, 1989.

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

LAWN, R. J.; LIKOSWE, A. A. Genotypic differences in leaf area maintenance contribute to differences in recovery from water stress in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 59, p. 1075-1085, 2008.

LEVITT, J. **Responses of plant to environmental stresses**. London: Academic Press, 1972. 297p.

LIBÓRIO, P. H. S.; BÁRBARO, I. M.; NOBILE, F. O. Co-inoculação no desenvolvimento vegetativo e nodulação de plântulas de soja submetidas à calagem, fertilização nitrogenada e aplicação de micronutrientes. **Nucleus**, Ituverava- SP, v. 12, n. 2, p. 245-246, 2015.

MENGEL, K.; KIRBY, E. A. **Principles of Plant Nutrition**. Bern: International Potash Institute, 2001. 687p.

MONEN, N. N.; CALRSON, R. E.; SHAW, R. H.; ARJMAND, O. Moisture-stress effects on the yield components of two soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v. 71, p. 86-90, 1979.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MUMBACH, G. L.; KOTOWSKI, I. E.; SCHNEIDER, F. J. A., MALLMANN, M. S.; BONFADA, É. B.; PORTELA, V. O.; BONFADA, É. B.; KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Scientia Agraria**, Curitiba- PR, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2017.

NOGUEIRA, S. dos S. S.; NAGAI, V. Deficiência hídrica simulada nos diferentes estádios de desenvolvimento de um cultivar precoce de soja. **Bragantia**, v. 47, n. 1, p. 9-14, 1988.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, VINICUIS, S. G.; COSTA, J. P. V. Comportamento de sojasubmetida a materiais fertilizantes e inoculação com *Bradyrhizobium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações- MG, v. 15, n. 1, p. 66-72, 2017.

ORTOLANI, A. A.; CAMARGO, M. B. P. Influência dos fatores climáticos na produção. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1987. p.71-100.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PIMENTEL, C. **A relação da água com a planta**. Seropédica, Rio de Janeiro. EDUR, 2004. 192p.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDINI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDINI, J. I. Fixação biológica no nitrogênio simbiótica e associativa. In: **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa- MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153- 174.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.

ROY-MACAULEY, H., Y. ZUILY-FODIL, M. KIDRIC, A. T. PHAM THI e J. VIEIRA DA SILVA. Effect of drought stress on proteolytic activities in Phaseolus and Vigna leaves from sensitive and resistant plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, n.1, p.90-96, 1992.

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

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. 314 p.

SINCLAIR T. R.; LUDLOW, M. M. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 329-341, 1986.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SIONIT, N.; KRAMER, P. J. Water potential and stomatal resistance of sunflower and soybean subjected to water stress during various growth stages. **Plant Physiology**, v. 58, p. 537-40, 1976.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TILAK, K. V. B. R.; SINGH, C. S.; ROY, N. K.; SUBA RAO, N. S., *Azospirillum brasiliense* and *Azotobacter chroococcum* inoculum: effect on yield of maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Soil Biology Biochemistry**., Oxford, v.14, p.417-418, 1982.

ZLATEV, Z.; LIDON, F. C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emirates Journal Food Agriculture**, Dubai, v. 24, n. 1, p. 57-72, 2012.

ZOZ, T.; STEINER, F.; GUIMARÃES, V. F.; CASTAGNARA, D. D.; MEINERZ, C. C.; FEY, R. Peroxidase activity as an indicator of water deficit tolerance in soybean cultivars. **Bioscience Journal**, Uberlândia- MG, v. 29, Supplement 1, p. 1664-1671, 2013.

## **CAPITULO 2. INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA COM RIZOBACTÉRIAS PARA AMENIZAR OS EFEITOS ADVERSOS DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**RESUMO:** O uso de rizobactérias podem atenuar os efeitos prejudiciais da deficiência hídrica no crescimento das plantas, por modificar a fisiologia da planta e promover a maior tolerância à seca. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada no crescimento e na indução da tolerância das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] à deficiência hídrica. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial  $3 \times 4$  com quatro repetições. Os tratamentos constituíram de três níveis de regime hídrico [100% da capacidade de campo (controle), 50% do controle (estresse moderado) e 25% do controle (estresse severo)] e de quatro tratamentos de inoculação: i) controle (sem inoculação); ii) inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; iii) inoculação com *Azospirillum brasilense*; e, iv) coinoculação com *B. japonicum* + *A. brasilense*. Durante o período de restrição hídrica foi avaliado o conteúdo relativo de água (CRA), e a tolerância protoplasmática. Após a exposição das plantas à deficiência hídrica foram determinadas as variáveis de nodulação, de crescimento, produção de biomassa seca das plantas. Os resultados evidenciaram que a inoculação isolada de *A. brasilense* não amenizou os efeitos da deficiência hídrica. A inoculação das sementes de soja com *B. japonicum* e *A. brasilense* de forma isolada ou combinada não interferiu no CRA das plantas de soja sob condições de deficiência hídrica. A inoculação com *B. japonicum* se mostrou eficiente para a altura de plantas, número de vagens e biomassa seca das vagens, enquanto que em condições de deficiência hídrica moderada a inoculação com *B. japonicum* se mostrou eficiente para a nodulação em plantas de soja.

**Palavras-chave:** *Glycine max* (L.) Merrill., *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, seca.

SOYBEAN SEED INOCULATION WITH RHIZOBACTERIA TO AMELIORATE THE ADVERSE EFFECTS OF WATER DEFICIENCY. Cassilândia, 2018.

**ABSTRACT:**

The use of rhizobacteria can attenuate the damaging effects of water deficiency on plant growth by modifying plant physiology and promoting greater tolerance to drought. The objective of this study was to evaluate the effects of seed inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, either alone or in combination, on the growth and tolerance induction of soybean plants [*Glycine max* (L.) Merrill.] to water deficit. The experimental design was a randomized complete block design in a 3 × 4 factorial schemes with four replications. The treatments consisted of three water regime levels (100% of the field capacity (control), 50% of the control (moderate stress) and 25% of the control (severe stress) and four inoculation treatments: seeds uninoculated); ii) inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*; iii) inoculation with *Azospirillum brasilense*; and, iv) co-inoculation with *B. japonicum* + *A. brasilense*. During the water restriction period, the relative water content (RWC) and protoplasmic tolerance were evaluated. After the exposure of the plants to the water deficit were determined the variables of nodulation, growth, production of dry biomass of plants. The results evidenced that the isolated inoculation of *A. brasiliense* did not alleviate the effects of water deficiency. Inoculation of soybean seeds with *B. japonicum* and *A. brasilense* alone or in combination did not interfere with the CRA of soybean plants under conditions of water deficit. The inoculation with *B. japonicum* proved to be efficient for plant height, number of pods and dry biomass of the pods, whereas under conditions of moderate water deficiency inoculation with *B. japonicum* proved to be efficient for nodulation in soybean plants.

**Key words:** *Glycine max* (L.) Merrill., *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, drought.



## 2.1 Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merril.] é uma das principais culturas oleaginosas do mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor de soja do mundo, superado apenas pelos Estados Unidos da América (EUA). Na safra 2016/2017, a cultura ocupou uma área de 33,9 milhões de hectares, totalizando uma produção de 113,9 milhões de toneladas, e um rendimento médio de grãos de 3.360 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2017). Apesar do cenário favorável para o cultivo da soja no Brasil, a ocorrência de deficiência hídrica tem sido frequente, afetando a produtividade.

A deficiência hídrica reduz a absorção e o transporte de nutrientes das raízes para a parte aérea, devido à redução da taxa de transpiração e ao comprometimento da permeabilidade da membrana plasmática (YUNCAI e SCHMIDHALTER, 2005). Em condições de restrição hídrica, as plantas apresentam uma série de alterações morfofisiológicas, tais como redução da área foliar, da taxa de transpiração, da taxa fotossintética e da taxa de crescimento relativo (CHAVES et al., 2002; GAO et al., 2006; KRON et al., 2008; FIOREZE et al., 2011), além, da modificação da atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio e do carbono e mudanças nos níveis de antioxidantes (FLEXAS et al., 2006; GUNES et al., 2008). Algumas destas respostas fazem parte de estratégias que visam reduzir os efeitos prejudiciais da seca, constituindo, portanto, mecanismos de tolerância à seca.

Nas últimas décadas tem sido constatado aumento significativo do uso de microrganismos na agricultura (SINGH et al., 2011); dentre estes microrganismos, as bactérias encontradas na região da rizosfera, e comumente denominadas de rizobactérias, podem melhorar o crescimento das plantas por diversos mecanismos de interação, por exemplo, aumentando a tolerância das plantas à seca (BASHAN e BASHAN, 2005).

A inoculação de sementes com estirpes de *Azospirillum brasilense*, atuando como rizobactéria promotora do crescimento de planta (RPCP), pode estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO et al., 2008); aumento na atividade da nitrato redutase quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN et al., 2008); produção de hormônios vegetais como auxinas, citocininas (CROZIER et al., 1988; CACCIARI et al., 1989), giberilinas (BOTTINI et al., 1989), etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e uma variedade de outras moléculas (PERRIG et al., 2007); solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004; INAGAKI et al.,

2014); e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008).

Considerando os efeitos benéficos das rizobactérias *A. brasilense* no crescimento das plantas, iniciaram-se, nos últimos anos, os estudos com coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* em plantas leguminosas, como a soja, buscando ganho em nodulação e suprimento de nitrogênio, resultando em maior produção da planta (HUNGRIA et al., 2013). A tecnologia de coinoculação em leguminosas consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, os quais produzem efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos quando utilizados na forma isolada (BÁRBARO et al., 2009; HUNGRIA et al., 2013).

Nos casos em que se tem utilizado *A. brasilense* em plantas leguminosas, o efeito benéfico da associação com *Bradyrhizobium* spp. se deve, na maior parte, a capacidade que a rizobactéria tem de produzir hormônios vegetais, que resulta em maior crescimento do sistema radicular, e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (BÁRBARO et al., 2009; CASSÁN et al., 2009; BULEGON et al., 2014), o que pode aumentar a tolerância das plantas à seca. No Brasil, as rizobactérias mais estudadas são as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* por favorecerem o desenvolvimento vegetal (CASSÁN et al., 2008; HUNGRIA e NOGUEIRA, 2013), podendo amenizar os efeitos de ambientes desfavoráveis no crescimento das plantas.

Portanto, estudos que visam buscar estratégias de manejo que minimizam os efeitos deletérios da seca despontam como de grande interesse para pesquisa agrícola. O objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada no crescimento e na indução da tolerância das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica.

## **2.2 Material e Métodos**

### ***2.2.1. Localização e Caracterização do Experimento***

O experimento foi realizado em cultivo protegido, no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, em Cassilândia, MS (19°06'48" S; 51°44'03" W e altitude média de 470 m), de janeiro a março de 2017, em casa de vegetação com controle automático de temperatura e umidade relativa do ar. As condições ambientais

durante a condução do experimento foram: temperatura média do ar de 26 °C ( $\pm 2$  °C), umidade relativa do ar de 80% ( $\pm 5\%$ ) e densidade de fluxo de fótons fotossintético de 834  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\pm 220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Foram utilizados vasos plásticos com 12 L de capacidade, preenchidos com 10  $\text{dm}^3$  de solo arenoso peneirado em malha de 5 mm, proveniente da camada superficial de 0,0–0,20 m de um Neossolo Quartzarênico (SANTOS et al., 2013), e as principais propriedades químicas do solo são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades químicas do solo utilizado no experimento. UEMS/Cassilândia-MS, 2017

| pH<br>(CaCl <sub>2</sub> ) | P<br>(Mehlich-1)<br>mg dm <sup>-3</sup> | K <sup>+</sup>                                 | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | H <sup>+</sup> + Al <sup>3+</sup> | CTC                                | V    |
|----------------------------|---|--|------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------|
|                            |   | ----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ----- |                  |                  |                                   |                                    | %    |
| 4,6                        | 7,8                                     | 0,16   | 1,50             | 0,50             | 3,60                              | 5,80                               | 37,5 |
| B                          | S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>         | Cu <sup>2+</sup>                               | Fe <sup>2+</sup> | Mn <sup>2+</sup> | Zn <sup>2+</sup>                  | Al <sup>3+</sup>                   |      |
|                            |   | ----- mg dm <sup>-3</sup> -----                |                  |                  |                                   | cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> |      |
| 0,14                       | 3,9                                     | 0,7  | 76,0             | 60,4             | 0,8                               | 0,22                               |      |

A correção da acidez do solo foi realizada com a aplicação de 1,10 g de calcário por  $\text{dm}^3$  de solo (CaO: 38%; MgO: 11%; PRNT: 85%; PN: 62%), visando elevar a saturação por base do solo a 70%. Após a aplicação do calcário, o solo foi homogeneizado, umedecido até alcançar 80% da capacidade de retenção de água, e incubado por 30 dias. Decorrido esse período, o solo foi acondicionado nos vasos e, então, fertilizado com 40  $\text{mg dm}^{-3}$  de N (ureia), 300  $\text{mg dm}^{-3}$  de P (superfosfato triplo), 150  $\text{mg dm}^{-3}$  de K (cloreto de potássio), 15  $\text{mg dm}^{-3}$  de S (sulfato de cálcio), 2  $\text{mg dm}^{-3}$  de Cu (sulfato de cobre), 2  $\text{mg dm}^{-3}$  de Zn (sulfato de zinco), 1  $\text{mg dm}^{-3}$  de Mo (molibdato de amônio) e 1  $\text{mg dm}^{-3}$  de B (ácido bórico), seguindo as recomendações de Novais et al. (1991) para ensaios de vaso em condições controladas. A capacidade de retenção de água do solo sob condições de drenagem livre foi mensurada usando a taxa de decréscimo do teor de água de 0,1  $\text{g kg}^{-1} \text{dia}^{-1}$  como sugerido por Casaroli e Lier (2008), e o valor da capacidade máxima do solo em reter água foi de 210  $\text{g kg}^{-1}$ .

### 2.2.2. Delineamento Experimental e Tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial  $3 \times 4$ , com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por três níveis de regime hídrico [100% da capacidade de retenção de água do solo (controle), 50% do controle

(estresse moderado) e 25% do controle (estresse severo)] e por quatro tratamentos de inoculação das sementes [i) controle (sem inoculação); ii) inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; iii) inoculação com *Azospirillum brasilense*; e, iv) coinoculação com *B. japonicum* + *A. brasilense*.

Cada unidade experimental foi constituída por dois vasos, perfazendo um total de 96 vasos. Um dos vasos de cada repetição foi utilizado para as amostragens destrutivas, incluindo a área foliar, e acúmulo de biomassa seca das folhas, hastes, estruturas reprodutivas e raízes após 18 dias de exposição à deficiência hídrica. O outro vaso da repetição foi utilizado para a medição do conteúdo relativo de água das folhas e extravasamento de eletrólitos das células durante os 18 dias de seca e após o período de 3 dias de recuperação das plantas em condições bem irrigadas.

### **2.2.3. Implantação e Condução do Experimento**

Sementes de soja do cultivar 5D 615 RR, hábito de crescimento indeterminado, ciclo precoce de 105 a 114 dias, grupo de maturação 6.1, e massa de 1000 grãos de 155–185 g, foram previamente inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada. A inoculação das sementes com *B. japonicum* foi realizada com o inoculante comercial líquido Simbiose Nod Soja<sup>®</sup> (Simbiose: Agrotecnologia Biológica) contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (concentração mínima de  $7,2 \times 10^9$  células viáveis por mL), na dose de 300 mL para 50 kg de sementes. Para a inoculação com *A. brasilense* foi utilizado o inoculante comercial líquido AzoTotal<sup>®</sup> (Total Biotecnologia) que contém as estirpes AbV5 e AbV6 (concentração mínima de  $2,0 \times 10^8$  células viáveis por mL), na dose de 200 mL para 50 kg de sementes. A coinoculação foi realizada misturando as duas rizobactérias, nas mesmas proporções utilizadas quando inoculadas isoladamente, ou seja, 300 mL do inoculante contendo *B. japonicum* + 200 mL de inoculante contendo *A. brasilense* para cada 50 kg de sementes de soja. As quantidades de inoculantes utilizadas foram dissolvidas em uma solução contendo  $2 \text{ mL kg}^{-1}$  de semente de aditivo para inoculante Protege<sup>®</sup> TS (Total Biotecnologia) após ambos os produtos (inoculante + aditivo) foram aplicadas nas sementes. O aditivo para inoculante é constituído de metabólitos ativos de bactérias, complexo de açúcares e biopolímeros encapsulantes e tem a finalidade de melhorar a proteção e a viabilidade das bactérias sobre as sementes.

A semeadura da soja foi realizada no dia 12/01/2017, distribuindo-se oito sementes por vaso na profundidade de 2,0 cm (Apêndice 1), e aos cinco dias após a emergência,

realizou-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. Durante os primeiros 30 dias após a emergência das plantas, todos os tratamentos foram irrigados para manter o conteúdo de água próximo a 100% da capacidade de retenção de água do solo. Posteriormente, no dia 17/02/2017, no início do período de florescimento da soja (R1), a imposição da restrição hídrica (50% e 25% da capacidade de retenção de água do solo) foi realizada por um período de 18 dias. Após este período, no dia 07/03/2017, as plantas foram reidratadas, ou seja, foi elevado o conteúdo de água do solo à 100% da capacidade de retenção de água, por 3 dias. O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9:00 e 15:00 horas), com o auxílio de sensores de umidade, instalados no centro dos vasos de cada tratamento, na profundidade de 12 cm.

Aos 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após a imposição da restrição hídrica, e aos 3 dias após a reidratação das plantas de soja foram mensurados o conteúdo relativo de água (CRA) das folhas e aos 18 dias após a imposição da restrição hídrica e aos 3 dias após a reidratação também foram avaliadas a tolerância protoplasmática, conforme as metodologias a seguir:

**Conteúdo relativo de água da folha (CRA):** Foi determinado seguindo-se a metodologia proposta por Barrs (1968), com modificações. Foram retirados quinze discos de 8,50 mm de diâmetro, de folhas totalmente expandidas (Apêndice 2), sempre antes do nascer do sol (pre-dawn), para que a umidade relativa (condições de déficit de pressão de vapor) estivesse uniforme para todas as medidas em todos os dias de avaliação. Os discos foliares foram imediatamente pesados em balança de precisão de 0,0001 g para obtenção da biomassa fresca (BF). Em seguida, os discos foliares foram acondicionados em placas de petry com água destilada (Apêndice 3) e mantidos em uma câmara incubadora à temperatura de 25 °C. Após 6 horas, os discos foram novamente pesados, após a retirada do excesso de água superficial com papel toalha, obtendo-se a biomassa túrgida ou saturada (BT). Por fim, os discos foliares foram colocados em sacos de papel, e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, até atingirem massa constante (24 h). Em seguida, os discos foram pesados para obtenção da biomassa seca (BS).

O CRA foi definido como a relação entre o conteúdo de água de uma amostra de folha imediatamente após a sua coleta (BF) e o conteúdo de água da mesma amostra após a recuperação total da turgescência (BT), comparativamente a biomassa seca (BS), sendo determinado pela seguinte equação:

$$\text{CRA} = [(\text{BF} - \text{BS}) / (\text{BT} - \text{BS})] \times 100$$

**Tolerância protoplasmática (Extravasamento de eletrólitos):** A determinação indireta da tolerância protoplasmática foi realizada, utilizando-se a metodologia descrita por

Lutts et al. (1996), com modificações. Com essa metodologia foi possível inferir sobre a tolerância protoplasmática celular à desidratação, através da quantidade de eletrólitos liberados pelo tecido foliar em água destilada, medida pela condutividade elétrica da solução. Para tanto, foram coletados 20 discos foliares com 8,50 mm de diâmetro, provenientes de folhas totalmente expandidas das duas plantas de cada unidade experimental. Os discos coletados foram lavados duas vezes com água destilada, e em seguida colocados em tubos de ensaio com 30 mL de água destilada, e mantidos em uma câmara incubadora à temperatura de 25 °C, por 6 horas. Posteriormente, procedeu-se a leitura da condutividade elétrica da solução, que foi considerada como sendo a condutividade livre (CL). Os discos foram, então, submetidos ao banho maria a 100 °C por 1 h, e após o resfriamento mensurou-se novamente a condutividade elétrica, que foi denominada como a condutividade total (CT). As leituras da condutividade elétrica foram realizadas com um condutivímetro de bancada modelo Digimed DM 31. A partir dos dados de extravasamento dos eletrólitos foi calculada porcentagem de dano das membranas celulares, seguindo a seguinte fórmula:  $DM (\%) = (CL/CT) \times 100$ .

Após os 18 dias de exposição das plantas de soja a deficiência hídrica foram determinadas as seguintes variáveis: número de folhas (NF), contando o número de folhas trifolioladas desenvolvidas presentes na planta; diâmetro do caule (DC), mensurado com auxílio de paquímetro digital, precisão de 0,01mm; altura de planta (AP), medindo-se a haste principal do colo até o meristema apical com o auxílio de régua graduada em centímetro (cm); número de vagens (NV), obtido pela contagem do número de vagens presentes das plantas; número de nódulos (NN), obtido pela contagem do número de nódulos presentes nas raízes. Em seguida, os nódulos foram destacados e colocados em estufa por 48 horas a 65 °C com pesagem do material seco em balança analítica com precisão de 0,0001 g e, então, obtido a biomassa seca dos nódulos.

O volume radicular (VR) foi determinado pelo método de deslocamento de água, utilizando uma proveta de 100 mL graduada em mililitros (mL), portanto, com precisão de  $\pm 1,0 \text{ cm}^3$ . A área foliar (AF) foi determinada seguindo metodologia proposta por Benincasa (2003), com modificações. Após a separação de todas as folhas das duas plantas por repetição, foram retirados 10 discos foliares de área conhecida de  $4 \times 6 \text{ cm}$  ( $24,0 \text{ cm}^2$ ), que foi considerada a área foliar da amostra ( $AF_{\text{Amostra}}$ ). Em seguida, após a secagem em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C ( $\pm 1,0 \text{ °C}$ ), até atingirem biomassa constante, foi determinada a biomassa seca da amostra ( $BS_{\text{Amostra}}$ ) e a biomassa seca das folhas (BSF). A área foliar total (AF) foi obtida através da seguinte equação:  $AF = [(AF_{\text{Amostra}} \times BSF) / BS_{\text{Amostra}}]$ .

Para a mensuração da biomassa seca das folhas (BSF), do caule (BSC), das vagens (BSV), da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e total (BST), as plantas foram seccionadas em folha, caule, estrutura reprodutiva, e raiz, em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel, colocadas para secar em estufa de circulação de ar forçada com temperatura de 65 °C ( $\pm 2,0$  °C) por 72 h e, posteriormente, pesadas em balança analítica com precisão de 0,0001 g, e os resultados expressos em g planta<sup>-1</sup>. A biomassa seca da parte aérea foi obtida com a soma da biomassa seca das folhas, do caule e das vagens; a biomassa seca total foi obtida com a somatória de todas as partes da planta (folhas, caule, estruturas reprodutivas e raízes).

Uma visão geral do experimento dentro da casa-de-vegetação e os efeitos da restrição hídrica por 18 dias no crescimento das plantas de soja são apresentadas nos Apêndices 4 e 5.

#### ***2.2.4. Análises Estatísticas***

Os dados foram previamente testados quanto à normalidade pelo teste de Fisher-Snedecor à 5% de significância. Para os dados que não apresentaram distribuição normal aplicou-se a transformação de dados utilizando  $\sqrt{x + 0,5}$ . Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância e os efeitos significativos do teste F ( $p = 0,05$ ) foram comparados pelo teste t (LSD), a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico Sisvar versão 5.3 para Windows (Software de Análises Estatísticas, UFLA, Lavras, MG, BRA).

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. Avaliações Durante o Período de Imposição da Restrição Hídrica

#### 2.3.1.1. Conteúdo relativo de água das folhas

Os resultados da análise de variância para o conteúdo relativo de água (CRA) das folhas mensurado durante o período de deficiência hídrica são mostrados na Tabela 2. Os resultados da análise de variância não reportaram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) da interação entre os fatores inoculação das sementes e níveis de deficiência hídrica em nenhuma das avaliações realizadas (Tabela 2). Portanto, os resultados do conteúdo relativo de água das folhas foram apresentados de forma isolada para cada um dos fatores estudados (Tabela 3).

**Tabela 2.** Resumo das análises de variância para o conteúdo relativo de água das folhas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615 RR] durante o período de 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS/Cassilândia, 2017

| Causas de variação | Probabilidade > F |                  |                  |                  |                   |                   |                   |                   |
|--------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                    | CRA <sub>1</sub>  | CRA <sub>3</sub> | CRA <sub>6</sub> | CRA <sub>9</sub> | CRA <sub>12</sub> | CRA <sub>15</sub> | CRA <sub>18</sub> | CRA <sub>21</sub> |
| Bloco              | 0,568             | 0,532            | 0,489            | 0,421            | 0,265             | 0,751             | 0,833             | 0,642             |
| Inoculação (I)     | 0,612             | 0,290            | 0,128            | 0,418            | 0,605             | 0,622             | 0,528             | 0,178             |
| Deficiência (D)    | 0,098             | <0,000           | <0,000           | <0,000           | <0,000            | <0,000            | <0,000            | 0,134             |
| Interação (I x D)  | 0,327             | 0,462            | 0,628            | 0,374            | 0,137             | 0,267             | 0,081             | 0,141             |
| CV (%)             | 8,28              | 9,13             | 7,25             | 9,18             | 8,02              | 8,69              | 7,24              | 6,76              |

CRA: conteúdo relativo de água. CV: coeficiente de variação.

O CRA das plantas submetidas ao controle se manteve constante durante todo o período de avaliação, com valores variando de 91 a 94% (Tabela 3). Os níveis de deficiência hídrica afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o CRA a partir do terceiro dia de exposição das plantas de soja à deficiência hídrica (Tabela 3). As plantas submetidas aos níveis de deficiência hídrica apresentaram os menores valores de CRA a partir do terceiro dia de exposição das plantas a restrição hídrica. Estes resultados devem-se à menor disponibilidade de água no solo nestes regimes de irrigação. As plantas submetidas aos níveis de 50% (estresse moderado) e 25% (estresse severo) da capacidade de retenção de água do solo por 18 dias apresentaram valores de CRA de 82% e 61%, respectivamente (Tabela 3). Resultados semelhantes foram reportados por Fioreze et al. (2011), o qual avaliando o efeito da restrição hídrica em três cultivares de soja, constataram que o CRA nas plantas sob manejo normal de



irrigação (100% da capacidade do solo em reter água) se manteve constante (> 90%) durante todo o período de avaliação. Por sua vez, as plantas submetidas ao nível de 65% da capacidade de retenção de água do solo (-0,1 MPa), o CRA nas folhas de soja foi reduzido para valores próximos a 45% após 5 dias de restrição hídrica.

**Tabela 3.** Efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica no conteúdo relativo de água das folhas (CRA) de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] no “pre down” durante os 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS, Cassilândia-MS, 2017

| Causas de variação                         | Dias após a imposição da restrição hídrica |      |      |      |      |      |      |                 |
|--|--|------|------|------|------|------|------|-----------------|
|  | 1  | 3    | 6    | 9    | 12   | 15   | 18   | 21 <sup>†</sup> |
| Nível de deficiência hídrica               |  |      |      |      |      |      |      |                 |
| Controle (100% cc)                         | 94 a                                       | 94 a | 93 a | 94 a | 93 a | 93 a | 91 a | 93 a            |
| Moderado (50% cc)                          | 89 a                                       | 87 b | 81 b | 82 b | 80 b | 81 b | 82 b | 91 a            |
| Severo (25% cc)                            | 89 a                                       | 80 c | 72 c | 64 c | 54 c | 58 c | 61 c | 92 a            |
| Inoculação das sementes                    |  |      |      |      |      |      |      |                 |
| Controle                                   | 90 a                                       | 88 a | 81 a | 79 a | 86 a | 79 a | 79 a | 93 a            |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i>            | 90 a                                       | 87 a | 82 a | 81 a | 85 a | 77 a | 78 a | 91 a            |
| <i>Azospirillum brasilense</i>             | 91 a                                       | 88 a | 82 a | 80 a | 85 a | 78 a | 79 a | 92 a            |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 91 a                                       | 86 a | 81 a | 78 a | 84 a | 75 a | 76 a | 92 a            |
| CV (%)                                     | 8,28                                       | 9,13 | 7,25 | 9,18 | 8,02 | 8,69 | 7,24 | 6,76            |

Média seguida pela mesma letra para os fatores deficiência hídrica e inoculação das sementes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

<sup>†</sup> Conteúdo relativo de água das folhas de soja mensurado após três dias de reidratação das plantas.

Em condições de deficiência hídrica suave, moderada e severa, Ennahli e Earl (2005) observaram relação linear entre o CRA e o potencial hídrico das folhas em plantas de algodão. James et al. (2008) constataram variações genéticas, dentro de grupos de cultivares e espécies selvagens de soja, para características de interesse no estudo da tolerância à seca, como CRA e potencial hídrico, tendo encontrado o CRA como um excelente fator para determinação de variações genéticas, nos valores de ajuste osmótico em folhas de soja.

A inoculação das sementes com *B. japonicum* e *A. brasilense* de forma isolada ou combinada não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) o CRA das folhas de soja em nenhuma das avaliações realizadas (Tabela 3). Estes resultados indicam que a inoculação de bactérias simbióticas e associativas nas sementes não interferiu no potencial hídrico das folhas de soja durante a exposição das plantas à deficiência hídrica. De acordo com Taiz et al. (2017), a perda de turgescência em decorrência da redução do CRA é o efeito biofísico significativo

que se manifesta mais cedo com a ocorrência da deficiência hídrica, portanto, atividades dependentes da turgescência são as mais sensíveis à seca.

### 2.3.1.2. Tolerância protoplasmática (Liberação de eletrólitos)

Os resultados da porcentagem de dano das membranas celulares das folhas de soja em função da inoculação das sementes e dos níveis de deficiência hídrica são mostrados na Tabela 4. Os níveis de deficiência hídrica e a inoculação das sementes com *B. japonicum* e *A. brasilense* de forma isolada ou combinada influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de dano das membranas celulares das plantas de soja (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeitos da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica na porcentagem de dano das membranas celulares das folhas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica e após 3 dias de reidratação. UEMS, Cassilândia-MS, 2017

| Inoculação das sementes                    | Nível de deficiência hídrica |                      |                    | Média   |
|--|------------------------------|----------------------|--------------------|---------|
|  | Controle<br>(100% cc)        | Moderada<br>(50% cc) | Severa<br>(25% cc) |         |
| Após 18 dias de restrição hídrica          |                              |                      |                    |         |
| Controle                                   | 10,81                        | 20,81                | 28,58              | 20,07 b |
| <i>B. japonicum</i>                        | 8,68                         | 15,39                | 23,42              | 15,83 a |
| <i>A. brasilense</i>                       | 6,94                         | 16,48                | 20,39              | 14,60 a |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 6,73                         | 15,82                | 16,54              | 13,03 a |
| Média                                      | 8,29 A                       | 17,12 B              | 22,23 C            |         |
| CV (%)                                     | 7,84                         |                      |                    |         |
| Após 3 dias de reidratação das plantas     |                              |                      |                    |         |
| Controle                                   | 10,64                        | 18,23                | 20,22              | 16,36 c |
| <i>B. japonicum</i>                        | 10,93                        | 10,89                | 11,61              | 11,14 b |
| <i>A. brasilense</i>                       | 9,28                         | 10,64                | 9,52               | 9,81 a  |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 9,90                         | 9,30                 | 8,18               | 9,13 a  |
| Média                                      | 10,19 A                      | 12,26 B              | 12,38 B            |         |
| CV (%)                                     | 6,78                         |                      |                    |         |

Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha, e letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Os maiores valores de dano de membrana foram obtidos nas plantas de soja submetidas às condições de restrição hídrica (Tabela 4). De acordo com Pimentel et al. (2004), a exposição das plantas às condições de restrição hídrica resultam no aumento da liberação de eletrólitos através do tecido foliar. Garcia (1997) reportou que com a redução do CRA, ocorre aumento na liberação de eletrólitos. Uma das principais funções da membrana

plasmática é regular a permeabilidade, quando a mesma sofre algum dano físico ou químico essa permeabilidade é perdida, ocorrendo o extravasamento de eletrólitos (THOMASHOW, 1999).

Durante a exposição da deficiência hídrica, as plantas apresentam alteração no transporte de elétrons mediado pelos radicais superóxido formados ( $O_2^-$ ) que competem com o  $NADP^+$  para redução no fotossistema I (REDDY et al., 2004). Como consequência, pode ocorrer à perda e redução das proteínas D1 e D2 do fotossistema II (REDDY et al., 2004). A diminuição da assimilação de  $CO_2$ , a redução das atividades dos fotossistemas e a alteração no sistema de transporte de elétrons, aceleram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), via cloroplasto que tem a capacidade de danificar estruturas e componentes celulares importantes (ASADA, 1999), como as membranas plasmáticas, causando danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando receptores e enzimas e aumentando a permeabilidade a íons (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

As rizobactérias podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, dentre elas a produção de fitohormônios como auxinas e citocininas (CROZIER et al., 1988; CACCIARI et al., 1989); o acúmulo de auxinas na parte aérea protege o aparato fotossintético e a ultraestrutura cloroplástica, diminuindo o efeito da restrição hídrica, permitindo uma recuperação mais rápida com a reidratação (PIMENTEL, 2004). Explicando assim o menor dano de membrana após o período de reidratação, que era de 22% com 18 dias de restrição hídrica, e 12% após três dias de reidratação.

### ***2.3.2. Avaliações Após o Período de Imposição da Restrição Hídrica***

Os resultados das análises de variância reportaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) para a interação entre os fatores inoculação das sementes e níveis de deficiência hídrica para a maioria das variáveis mensuradas, exceto para altura de planta, número de vagens, biomassa seca de vagens e razão de massa das folhas das plantas de soja (Tabela 5). Esses efeitos significativos para a interação entre os fatores estudados indicam que a resposta da soja a inoculação das sementes com *B. japonicum* e/ou *A. brasilense* é diferente entre os diferentes níveis de deficiência hídrica.

**Tabela 5.** Análises de variância para as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (BSN), altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de vagens (NV), área foliar (AF), volume radicular (VR), biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de vagens (BSV), biomassa seca do caule (BSC), biomassa seca das raízes (BSR), biomassa seca da parte aérea (BSPA), e biomassa seca total (BST) das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615 RR] em função dos fatores inoculação das sementes e nível de restrição hídrica. UEMS/Cassilândia, 2017

| Causas de variação | Probabilidade > F |        |        |        |        |        |        |
|--------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                    | NN                | BSN    | AP     | DC     | NF     | NV     | AF     |
| Bloco              | 0,037             | 0,200  | 0,008  | <0,000 | 0,620  | 0,802  | 0,658  |
| Inoculação (I)     | <0,000            | <0,000 | 0,040  | 0,018  | 0,236  | 0,179  | <0,000 |
| Deficiência (D)    | <0,000            | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 |
| Interação (I x D)  | <0,000            | <0,000 | 0,292  | 0,013  | <0,007 | 0,067  | 0,001  |
| CV (%)             | 13,72             | 4,22   | 3,51   | 4,48   | 15,02  | 7,62   | 2,25   |
|                    | VR                | BSF    | BSV    | BSC    | BSR    | BSPA   | BST    |
| Bloco              | 0,200             | 0,308  | <0,000 | 0,989  | 0,469  | 0,212  | 0,571  |
| Inoculação (I)     | 0,136             | <0,000 | 0,005  | <0,000 | 0,030  | <0,000 | 0,001  |
| Deficiência (D)    | <0,000            | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 | <0,000 |
| Interação (I x D)  | 0,001             | <0,000 | 0,055  | <0,000 | 0,001  | <0,000 | <0,000 |
| CV (%)             | 12,30             | 3,10   | 4,59   | 6,56   | 8,73   | 2,69   | 2,68   |

CV: coeficiente de variação.

### 2.3.2.1. Nodulação radicular da soja

No nível de deficiência hídrica severa (25% da capacidade de retenção hídrica) a coinoculação e o controle não apresentaram diferença estatística entre si para o número de nódulos, no entanto diferiram da inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* quando aplicados isolados; para a biomassa seca de nódulos a coinoculação apresentou estatisticamente maiores valores em relação aos demais tratamentos, quando submetida ao nível de deficiência hídrica severa. Para o nível de deficiência hídrica moderada (50% da capacidade de retenção hídrica) a inoculação com *B. japonicum* obteve a maior média, tanto para o número de nódulos como para a biomassa seca dos nódulos. No fator nível de deficiência hídrica com 100% da capacidade de retenção, o controle obteve a maior média tanto para o número de nódulos como para a massa seca dos nódulos (Tabela 6).

A nodulação está relacionada com os fitohormônios presentes na planta, o *A. brasilense* pode estimular a produção desses hormônios (KUSS et al., 2007), aumentando a capacidade de nodulação. O que pode explicar os resultados encontrados na coinoculação

submetidos ao nível de deficiência hídrica severa, quando comparada as inoculações de forma isolada com *B. japonicum* e *A. brasilense*. No entanto, a coinoculação não apresentou diferença estatística quando comparada ao controle, podendo ter ocorrido uma competição entre as bactérias nativas, de forma que essas dependem dos sítios de ligações presentes nas raízes (PLAZINSKI e ROLFE, 1985; FAGAN et al., 2007).

**Tabela 6.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica no número de nódulos e na biomassa seca dos nódulos por planta de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas aos diferentes níveis de deficiência hídrica. UEMS, Cassilândia-MS, 2017

| Inoculação das sementes                    | Nível de deficiência hídrica |                      |                    | Média |
|--|------------------------------|----------------------|--------------------|-------|
|  | Controle<br>(100% cc)        | Moderada<br>(50% cc) | Severa<br>(25% cc) |       |
| Número de nódulos por planta*              |                              |                      |                    |       |
| Controle                                   | 439 aA                       | 92,7 bC              | 243 aB             | 258   |
| <i>B. japonicum</i>                        | 277 bA                       | 308,2 aA             | 81 bB              | 222   |
| <i>A. brasilense</i>                       | 172 cA                       | 42,7 cB              | 62 bB              | 92    |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 167 cAB                      | 109,7 bB             | 216 aA             | 164   |
| Média                                      | 264                          | 138                  | 150                |       |
| Biomassa seca dos nódulos* (g/planta)      |                              |                      |                    |       |
| Controle                                   | 1,41 aA                      | 0,57 abB             | 0,36 bC            | 0,79  |
| <i>B. japonicum</i>                        | 1,09 bA                      | 0,69 aB              | 0,36 bC            | 0,71  |
| <i>A. brasilense</i>                       | 1,05 bA                      | 0,45 bB              | 0,25 bC            | 0,59  |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 0,93 bA                      | 0,52 bB              | 0,60 aB            | 0,69  |
| Média                                      | 1,12                         | 0,55                 | 0,39               |       |

Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha, e letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade. \*Dados originais.

Quando submetida ao nível de deficiência hídrica severa a maior biomassa seca de nódulos foi constatada em plantas coinoculadas. Hungria et al. (2001) relata que a nodulação é influenciada pela temperatura, e que em situações de deficiência hídrica esses dois fatores atuando em conjunto afeta a massa de nódulos em todos os estádios de desenvolvimento, limitando a FBN; no entanto a nodulação está relacionada com os fitohormônios presentes na planta, assim o *A. brasilense* pode estimular a produção de hormônios promotores do crescimento (KUSS et al., 2007), aumentando a capacidade de nodulação.

Cassán et al. (2009) com a hipótese de que a inoculação e/ou coinoculação pode promover a produção de reguladores de crescimento, relataram que o número de nódulos foi superior em plantas de soja coinoculadas com *B. japonicum* e *A. brasilense*. Braccini et al. (2016) reportaram que a coinoculação aumentou o número de nódulos, submetidos a

diferentes modos de aplicação de *B. japonicum* e *A. brasilense*, e da adubação nitrogenada na cultura da soja. Segundo Benintende et al., (2010) a coinoculação em condições de deficiência hídrica aumentou o peso dos nódulos em relação a inoculação com *B. japonicum*.

Em condições de laboratório, Bulegon et al., (2014) analisaram a nodulação em diferentes cultivares de soja inoculados e coinoculados com *B. japonicum* e *A. brasilense*, em que a inoculação com *A. brasilense*, ou coinoculação com *A. brasilense* e *B. japonicum* estimulam a nodulação.

#### 2.3.2.2. Crescimento e produção de biomassa seca das plantas

Os resultados de altura de planta, diâmetro do caule, número de folhas trifolioladas, número de vagens, área foliar e volume radicular das plantas de soja em função da inoculação das sementes e dos níveis de deficiência hídrica são mostrados na Tabela 7.

A altura de planta não apresentou interação entre os fatores nível de deficiência hídrica e inoculação das sementes. O fator inoculação das sementes reportou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), em que, as inoculações de forma isolada com *B. japonicum* e *A. brasilense* apresentaram as maiores médias; para o fator nível de deficiência hídrica o controle apresentou a maior média, diferindo-se dos demais tratamentos (Tabela 7). Segundo Bashan e Holguin (1997), a bactéria *Azospirillum* excreta fitohormônios que promove o crescimento dos vegetais, um deles é o ácido indolacético (AIA). Bulegon et al. (2016) relataram que a inoculação com bactérias diazotróficas aumentou os valores de altura de plantas, em função da inoculação e coinoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* em plantas de soja.

No diâmetro do caule, número de folhas e volume radicular houve diferença significativa entre os tratamentos apresentando interação entre os fatores nível de deficiência hídrica e inoculação das sementes (Tabela 7).

No nível de deficiência hídrica severa o controle apresentou a maior média para o diâmetro do caule, diferindo-se dos demais tratamentos; a inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*, de forma isolada, e a coinoculação não apresentou diferença estatística entre si (Tabela 7). O uso de rizobactérias em leguminosas contribuem para o fornecimento de nitrogênio utilizado na formação das plantas, promovendo o crescimento, destacando-se as pertencentes ao gênero *Azospirillum* (HUNGRIA et al., 2015). Bulegon et al. (2016) avaliando os componentes de produção da soja em função de dois cultivares de soja, submetidos à inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*, constataram que a coinoculação apresentaram diâmetros maiores para as plantas de soja.

**Tabela 7.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica na altura de planta, diâmetro do caule, número de folhas trifolioladas, número de vagens, área foliar e no volume radicular das plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica. UEMS, Cassilândia-MS, 2017

| Inoculação das sementes                                  | Nível de deficiência hídrica |                      |                    | Média   |
|--|------------------------------|----------------------|--------------------|---------|
|  | Controle<br>(100% cc)        | Moderada<br>(50% cc) | Severa<br>(25% cc) |         |
| Altura de planta (cm)                                    |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 54,2                         | 49,7                 | 40,2               | 48,0 b  |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 56,0                         | 49,5                 | 43,5               | 49,7 a  |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 55,2                         | 49,7                 | 42,0               | 48,9 ab |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 53,3                         | 47,7                 | 42,3               | 47,8 b  |
| Média  | 54,7 A                       | 49,1 B               | 42,0 C             |         |
| Diâmetro do caule (mm)                                   |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 7,87 aA                      | 6,71 bB              | 7,10 aB            | 7,23    |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 7,33 bA                      | 7,03 abA             | 6,21 bB            | 6,86    |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 7,58 abA                     | 7,12 abA             | 6,62 bB            | 7,10    |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 7,87 aA                      | 7,29 aB              | 6,59 bC            | 7,25    |
| Média  | 7,66                         | 7,04                 | 6,63               |         |
| Número de folhas trifolioladas por planta                |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 47,3 aA                      | 28,0 bB              | 22,3 bB            | 32,6    |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 46,7 aA                      | 32,3 abB             | 22,3 bC            | 33,8    |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 38,0 bA                      | 32,3 abA             | 30,7 aA            | 33,7    |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 42,0 abA                     | 37,7 aAB             | 30,7 aB            | 36,8    |
| Média  | 43,5                         | 32,6                 | 26,5               |         |
| Número de vagens por planta*                             |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 28,8                         | 20,8                 | 15,3               | 21,7 bc |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 30,0                         | 27,8                 | 17,5               | 25,1 a  |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 28,0                         | 21,0                 | 13,7               | 20,9 c  |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 31,7                         | 28,6                 | 13,0               | 24,4 ab |
| Média  | 29,6 A                       | 24,5 B               | 14,9 C             |         |
| Área foliar (dm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )*     |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 2,41 abA                     | 1,66 cB              | 1,35 cC            | 1,80    |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 2,28 bcA                     | 1,93 bB              | 1,46 bcC           | 1,89    |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 2,22 cA                      | 1,71 cB              | 1,57 abB           | 1,83    |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 2,52 aA                      | 2,09 aB              | 1,60 aC            | 2,07    |
| Média  | 2,36                         | 1,85                 | 1,49               |         |
| Volume radicular (cm <sup>3</sup> planta <sup>-1</sup> ) |                              |                      |                    |         |
| Controle   | 38,5 abA                     | 31,7 abB             | 23,7 bC            | 31,3    |
| <i>B. japonicum</i>                                      | 30,4 cA                      | 31,0 abA             | 27,6 abA           | 29,7    |
| <i>A. brasilense</i>                                     | 33,4 bcA                     | 35,8 aA              | 30,8 aA            | 33,4    |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>               | 42,7 Aa                      | 28,2 bB              | 26,2 abB           | 32,4    |
| Média  | 36,3                         | 31,7                 | 27,1               |         |

Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha, e letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.\*Dados originais.

Em condições de deficiência hídrica severa a coinoculação e a inoculação com *A. brasilense* apresentaram as maiores médias para o número de folhas trifolioladas, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 7). A inoculação com *A. brasilense* se mostrou eficiente quando submetida à baixa disponibilidade hídrica, em condições adversas esses microrganismos podem aumentar a produção de polissacarídeos, que servem como fonte de carbono e energia, além de estar relacionado com a fotossíntese (LAMM e NEYRA, 1981; TAL et al, 1985; SADASIVAN e NEIRA, 1987).

A coinoculação e a inoculação, isolada, com *B. japonicum* apresentaram as maiores médias no número de vagens por planta, reportando diferença estatística dos demais tratamentos, para o fator nível de deficiência hídrica severa; no entanto a inoculação com *A. brasilense* reportou a menor média, reduzindo o número de vagens por planta (Tabela 7). As bactérias diazotróficas realizam a conversão do N<sub>2</sub> a formas acessíveis, possuindo um grande potencial em aumentar a biomassa através da redução de N<sub>2</sub> em amônia (NH<sub>3</sub>) e da excreção de substâncias promotoras de crescimento das plantas (BHATTACHARJEE et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Braccini et al. (2016) reportaram que o número de vagens apresentou as maiores médias, para a inoculação com *B. japonicum* e para a coinoculação com *B. japonicum* + *A. brasilense* na cultura da soja em função dos diferentes modos de aplicação. Bulegon et al. (2016) com o objetivo de avaliar os componentes de produção na cultura da soja, submetidos a diferentes modos de inoculação, reportaram que a inoculação com *B. japonicum* apresentou a maior média.

A coinoculação e a inoculação, isolada, com *A. brasilense* apresentou as maiores médias, na área foliar, para as plantas submetidas ao nível de deficiência hídrica severa (Tabela 7). A área foliar da planta é responsável pela interceptação da energia radiante do sol que através do processo de fotossíntese, produz carboidratos, lipídios e proteínas, entre outros, compostos essenciais para o crescimento e o desenvolvimento da planta. O balanço entre auxinas e citocininas no vegetal determina o crescimento da parte aérea e radicular, quando ocorre maior concentração de auxinas tem-se a uma indução ao crescimento radical, assim favorecendo a parte aérea (SPAEPEN et al., 2009). Bulegon et al. (2016) reportaram que a inoculação com *A. brasilense*, e coinoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* incrementa área de foliar de plantas de soja no estágio V8.

A coinoculação e as inoculações de forma isolada com *A. brasiliense* e *B. japonicum*, submetidas ao nível de deficiência hídrica severa, apresentaram as maiores médias para o volume radicular (Tabela 7). O *A. brasiliense* apresenta um importante papel no ganho de



massa pelo sistema radicular, proporcionando maior alongamento das raízes e aumento do volume dos tecidos radiculares. Segundo Ferlini (2006), as rizobactérias proporcionam plantas com sistema radicular mais desenvolvido devido à capacidade auxiliar na produção de fitohormônios do crescimento. Burdman et al. (1996) e Dardanelli et al. (2008) relatam que a presença da bactéria *A. brasilense*, através da FBN e, pela produção de fitohormônios contribuem para o incremento do sistema radicular aumentando as radículas e o volume das raízes.

Bulegon et al. (2016) e Braccini et al. (2016) relataram em seus trabalhos a eficiência da coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* nos componentes de produção. As bactérias do gênero *A. brasilense*, são promotoras do crescimento e proporcionam maior eficiência na FBN, e as bactérias do gênero *B. japonicum* são recomendadas para a inoculação da cultura de soja, sendo apropriadas para adquirir o nitrogênio que a planta necessita para que seu ciclo ocorra, em associação as duas bactérias proporcionaram para as plantas de soja condições favoráveis para seu desenvolvimento (REIS et al., 2006).

A biomassa seca de folhas (BSF), do caule (BSC), das raízes (BSR), da parte aérea (BSPA) e a biomassa seca total (BST) apresentaram interação entre os níveis de deficiência hídrica e a inoculação das sementes; a massa de biomassa seca das vagens (BSV) não apresentou interação entre os níveis de deficiência hídrica e a inoculação das sementes (Tabela 8). A biomassa seca das folhas apresentou as maiores médias para todos os níveis de deficiência hídrica coinoculados com *A. brasilense* + *B. japonicum*. A coinoculação reportou as maiores médias de biomassa seca do caule para os níveis de deficiência hídrica controle e moderada. A coinoculação reportou o menor acúmulo de biomassa seca das vagens (Tabela 8).

Os maiores acúmulos de biomassa seca das raízes, biomassa seca da parte aérea e biomassa seca total, submetidas ao nível de deficiência hídrica severa, foram observados nas plantas de soja coinoculadas com *B. japonicum* + *A. brasilense*, e inoculadas com *A. brasilense* (Tabela 8). O crescimento da planta é função da produção e da distribuição de biomassa seca ao longo do ciclo de desenvolvimento (SALISBURY; ROSS, 2012).

Segundo Dobbelaere e Okon (2007), as bactérias diazotróficas oferecem benefícios como a produção de fitohormônios, dentre eles as auxinas. Com a biossíntese das auxinas ocorre à divisão e o crescimento celular, aumentando a capacidade de absorção de água e nutrientes; todos esses benefícios proporcionados pelas auxinas que irá refletir nos assimilados produzidos e translocados para os diferentes órgãos das plantas.

**Tabela 8.** Efeito da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada e dos níveis de deficiência hídrica na biomassa seca das folhas (BSF), das vagens (BSV), do caule (BSC), das estruturas reprodutivas (BSER), das raízes (BSR), da parte aérea (BSPA) e biomassa seca total (BST) plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill., cv. 5D 615RR] após 18 dias de exposição das plantas à deficiência hídrica. UEMS, Cassilândia-MS, 2017

| Inoculação das sementes                    | Nível de deficiência hídrica |                      |                    | Média  |
|--|------------------------------|----------------------|--------------------|--------|
|  | Controle<br>(100% cc)        | Moderado<br>(50% cc) | Severo<br>(25% cc) |        |
| Biomassa seca das folhas (g/planta)*       |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 4,85 bA                      | 2,89 cB              | 2,30 bC            | 3,35   |
| <i>B. japonicum</i>                        | 4,72 bA                      | 3,81 aB              | 2,50 abC           | 3,68   |
| <i>A. brasilense</i>                       | 3,97 cA                      | 3,30 bB              | 2,72 aC            | 3,33   |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 5,28 aA                      | 4,13 aB              | 2,79 aC            | 4,06   |
| Média                                      | 4,70                         | 3,53                 | 2,58               |        |
| Biomassa seca das vagens (g/planta)*       |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 3,03                         | 1,57                 | 0,66               | 1,75 a |
| <i>B. japonicum</i>                        | 3,33                         | 1,49                 | 0,36               | 1,73 a |
| <i>A. brasilense</i>                       | 3,07                         | 1,36                 | 0,50               | 1,65 a |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 2,96                         | 1,24                 | 0,33               | 1,52 b |
| Média                                      | 3,10 A                       | 1,42 B               | 0,47 C             |        |
| Biomassa seca do caule (g/planta)          |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 5,82 bA                      | 3,85 cB              | 3,43 bB            | 4,37   |
| <i>B. japonicum</i>                        | 5,38 cA                      | 4,80 aB              | 3,50 bC            | 4,56   |
| <i>A. brasilense</i>                       | 4,74 dA                      | 4,36 bAB             | 4,10 aB            | 4,40   |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 6,38 aA                      | 5,13 aB              | 3,86 abC           | 5,13   |
| Média                                      | 5,58                         | 4,53                 | 3,72               |        |
| Biomassa seca das raízes (g/planta)        |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 5,94 aA                      | 3,99 aB              | 3,11 bC            | 4,34   |
| <i>B. japonicum</i>                        | 4,80 bA                      | 3,74 aB              | 3,13 bC            | 3,89   |
| <i>A. brasilense</i>                       | 4,80 bA                      | 4,04 aB              | 3,83 aB            | 4,22   |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 5,09 bA                      | 3,83 aB              | 3,70 aB            | 4,21   |
| Média                                      | 5,16                         | 3,90                 | 3,44               |        |
| Biomassa seca da parte aérea (g/planta)*   |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 13,70 abA                    | 8,30 bB              | 6,40 bC            | 9,47   |
| <i>B. japonicum</i>                        | 13,43 bA                     | 10,10 aB             | 6,38 bC            | 9,96   |
| <i>A. brasilense</i>                       | 11,80 cA                     | 9,02 bB              | 7,33 aC            | 9,38   |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 14,62 aA                     | 10,51 aB             | 6,79 abC           | 10,70  |
| Média                                      | 13,39                        | 9,48                 | 6,77               |        |
| Biomassa seca total (g/planta)*            |                              |                      |                    |        |
| Controle                                   | 19,64 aA                     | 12,30 cB             | 9,51 bC            | 13,81  |
| <i>B. japonicum</i>                        | 18,23 bA                     | 13,85 abB            | 9,50 bC            | 13,87  |
| <i>A. brasilense</i>                       | 16,60 cA                     | 13,06 bcB            | 11,16 aC           | 13,60  |
| <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> | 19,71 aA                     | 14,33 aB             | 10,70 aC           | 14,91  |
| Média                                      | 18,55                        | 13,39                | 10,21              |        |

Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha, e letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade. \*Dados originais.

Braccini et al. (2016) e Bulegon et al. (2016) apresentaram resultados que corroboram com o presente trabalho, em que a coinoculação com *B. japonicum* + *A. brasilense* proporcionou maior acúmulo de biomassa seca da parte aérea. Segundo Barassi et al. (2008), o *Azospirillum* beneficia a produção de fitohormônios nos vegetais, e dentre as respostas fotossintéticas tem-se a produção de biomassa. Libório et al. (2015) não observaram diferença significativa na massa seca da parte aérea, ao avaliar os efeitos da coinoculação na nodulação e no crescimento das plantas de soja, associadas à adubação nitrogenada e micronutrientes nas sementes; porém para a massa seca das raízes obteve aumento nas plantas coinoculadas.

## 2.4. Conclusões

A inoculação das sementes com *A. brasilense* de forma isolada não amenizou o efeito negativo da deficiência hídrica nas plantas de soja.

A inoculação das sementes de soja com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* de forma isolada ou combinada não alterou o conteúdo relativo de água (CRA) das folhas de soja.

A inoculação com *B. japonicum* se mostrou eficiente para melhorar a altura de plantas, o número de vagens e a biomassa seca das vagens.

Em condições de deficiência hídrica moderada a inoculação das sementes com *B. japonicum* melhorou a nodulação das raízes de soja.

## 2.5 Referências Bibliográficas

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 50, p.601–639, 1999.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.

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

BARRS, H. D. Effect of cycle variations in gas Exchange under Constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 21, n. 5, p. 918-929, 1968.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. **In Encyclopedia of Soils in the Environment**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2005. p.103-115.

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

BENINCASA, M. P. M. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003, 41p.

BENINTENDE, S.; W. UHRICH, M. HERRERA, F. GANGGE, M. STERREN Y M. BENINTENDE. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. **Agriscientia**, Córdoba, v. 37, p. 71-77, 2010.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BRACCINI, A. L.; MARUICCI, G. E.; SUZUKAWA, A. K. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon- PR, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.

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

BULEGON, L.G., KLEIN, J., RAMPIM, L., GUIMARÃES, V.F., BATTISTUS, A.G., KESTRING, D., Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, p. 26–37, 2014.

BURDMAN, S.; VOLPIN, H.; KIGEL, J.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y. Promotion of nod Gene Inducers and Nodulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Roots Inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p.3030-3033, 1996.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, p. 151-153, 1989.

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

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; SALAMONE, I. G. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with stress in the field: photosynthesis and growth. **Annal of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos: V. 4 - SAFRA 2016/2017- 9º Levantamento junho 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 05 de maio de 2017.

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense* - plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A M.; SANDBERG, G. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833–2837, 1988.

DARDANELLI, M.S.; CÓRDOBA, F.J.F.; ESPUNY, M.R.; CARVAJAL, M.A.R.; DÍAZ, M.E.S.; SERRANO, A.M.G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology And Biochemistry.**, v. 40, p. 2713-2721, 2008.

DOBBELAERE S.; OKON Y. The plant growth promoting effects and plant responses. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation: origins, applications and research progress.** Dordrecht: Springer, 2007, p. 145–170.

ENNAHLI, S.; EARL, H. J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, v. 45, p. 2374-2382, 2005

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

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos – Agricultura**. 2006. Disponível em: <<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>>. Acessado em: 14 mar. 2017.

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

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist Journal**, v. 172, p. 73-82, 2006.

GAO, X.; ZOU, C.; WANG, L.; ZHANG, F. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. **Journal Plant Nutrition**, 29:1637-1647, 2006.

GARCIA, A. B.; ENGLER, J. A.; IYER, S.; GERATS, T.; MONTAGU, M. V.; CAPLAN, A. B. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. **Plant Physiology**, v. 115, p.159-169, 1997.

GUNES, A.; PILBEAM, D.J.; INAL, A.; COBAN, S. Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress. I: Growth, antioxidant mechanisms, and peroxidation and lipid peroxidation. **Communication Soil Science And Plant Analysis Journal**, v.39, p.1885-1903, 2008.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n.5, p.715-725, 1993.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Efeitos da co-inoculação. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 170, n. 1, 2013. p. 40-41.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with *Rhizobium* and *Azospirillum*: strategies to improve sustainability. **Biology 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 Science**, v. 6, n. 10, p. 811–817, 2015.

INAGAKI, A.M.; GUIMARÃES, V.F.; RODRIGUES, L.F.O.S.; SILVA, M.B.; DIAMANTE, M.S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T.M.; DUARTE JÚNIOR, J.B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 48, p. 3480-3487, 2014.

JAMES, A. T.; LAWN, R. J.; COOPER, M. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. I. Variation in soybean and wild *Glycine* spp. for epidermal conductance, osmotic potential and relative water content. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 59, p. 656-669, 2008.

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

KUSS, A.V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

LAMM, R. B.; NEYRA, C. A. Characterization and cyst production of *Azospirillum* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. Canadá, **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p.1320-1325, 1981.

LIBÓRIO, P. H. S.; BÁRBARO, I. M.; NOBILE, F. O. Co-inoculação no desenvolvimento vegetativo e nodulação de plântulas de soja submetidas à calagem, fertilização nitrogenada e aplicação de micronutrientes. **Nucleus**, Ituverava- SP, v. 12, n. 2, p. 245-246, 2015.

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p.207-218, 1996.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PIMENTEL, C. **A relação da água com a planta**. Seropédica, Rio de Janeiro. EDUR, 2004. 192p.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba: Nobel, 2000. 468p.

PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. G. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 984- 989, 1985.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDINI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDINI, J. I. Fixação biológica no nitrogênio simbiótica e associativa. In: **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa- MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153- 174.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasiliense* ATCC 29145. **Journal Bacteriol**, Washington, v. 169, p. 1670-1677, 1987.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das Plantas**. 4. ed. Estados Unidos: Cengage Learning, 2013. 772 p.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In L. C. VAN LOON editor: **Advances in Botanical Research**, v. 51, Burlington: Academic Press, p. 283-320, 2009.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.



TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-b-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasiliense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.608-613, 1985.

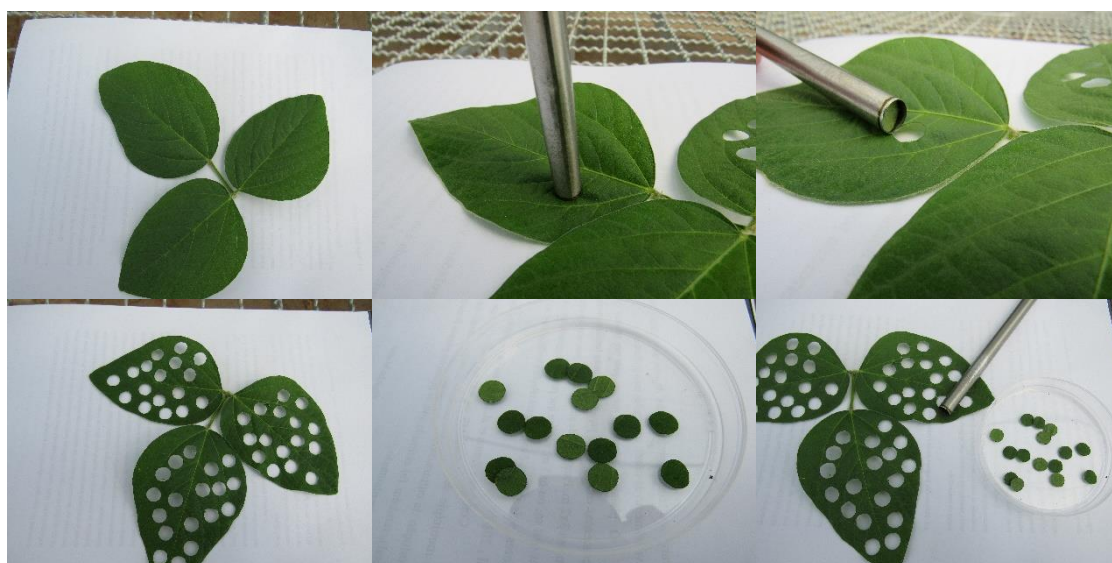
THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 50, p. 571-599, 1999.

YUNCAI, H.; SCHMIDHALTER, U. Drought and salinity: A comparison of the effects of drought and salinity. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 541-549, 2005.

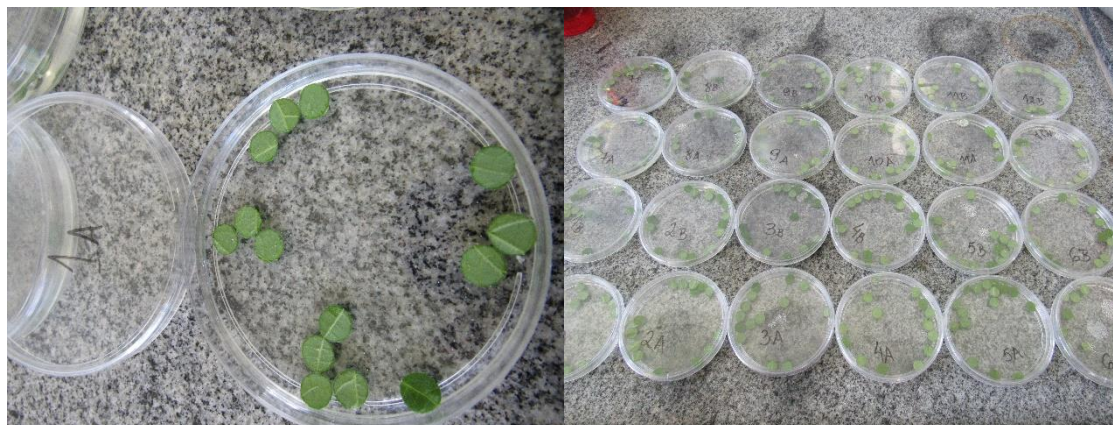
**APÊNDICES**



**Apêndice 1.** Detalhe da operação de semeadura do cultivar de soja 5D615 RR. Foram semeadas 8 sementes por vasos e após o desbaste foram deixadas duas plantas. UEMS/Cassilândia, 2017.



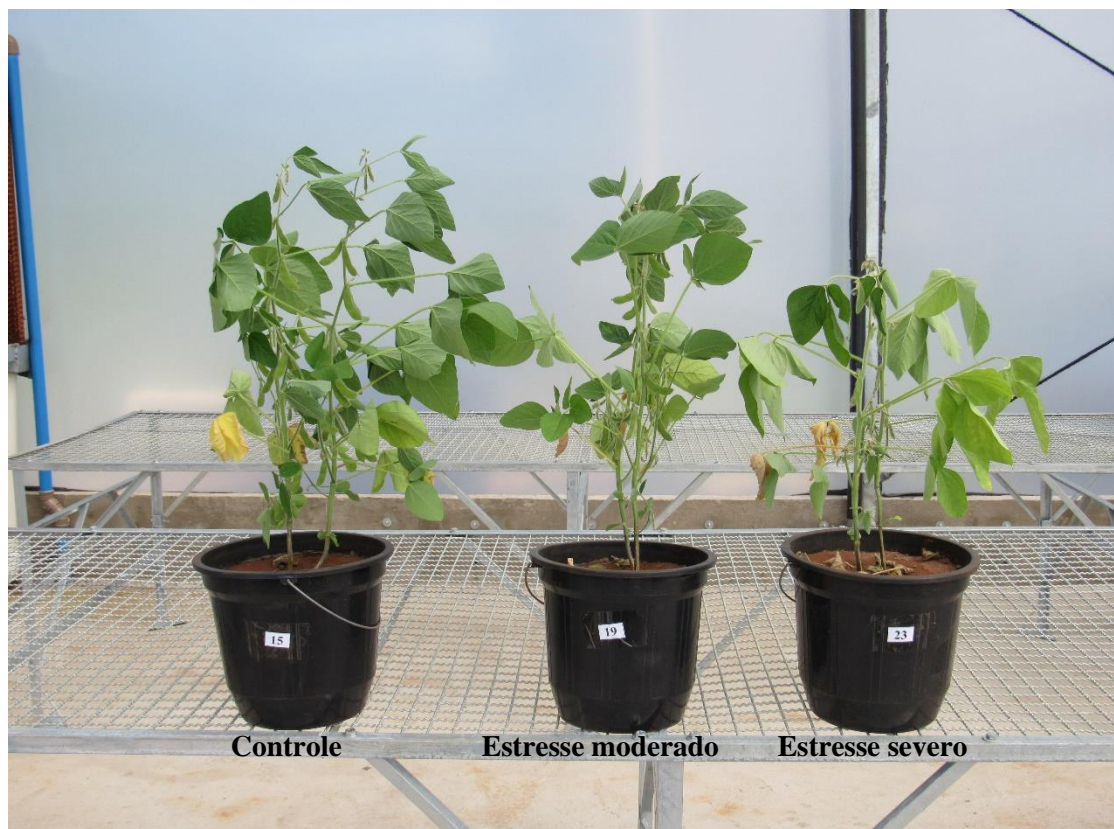
**Apêndice 2.** Ilustração das operações para a coleta dos discos foliares de soja cv. 5D615 RR, as avaliações foram realizadas entre as 4:30 e 5:30 horas da manhã (pre-dawn). UEMS/Cassilândia, 2017.



**Apêndice 3.** Ilustração dos discos foliares acondicionados em placas de petry com água destilada para a obtenção da massa turgida, após 6 hs de imersão. UEMS/Cassilândia, 2017.



**Apêndice 4.** Visão geral do experimento dentro da casa-de-vegetação climatizada. UEMS/Cassilândia, 2017.



**Apêndice 5.** Detalhe do crescimento das plantas de soja cv. 5D 615 RR cultivada com 100% (controle), 50% (estresse moderado) e 25% (estresse severo) da capacidade de retenção de água do solo por 18 dias. UEMS/Cassilândia, 2017.