



Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas

Lucas Guilherme BULEGON^{1*}, Vandeir Francisco GUIMARÃES¹, Vanessa Aline EGEWARTH¹,
Marcelo Gonçalves dos SANTOS¹, Anderson Luis HELING¹, Silvio Douglas FERREIRA¹,
Ana Paula Gonçalves da Silva WENGRAT¹, Andre Gustavo BATTISTUS¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paranaenses, Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

* E-mail: lucas_bulegon@yahoo.com.br

Recebido em dezembro/2015; Aceito em julho/2016.

RESUMO: Objetivou-se estudar o crescimento e as trocas gasosas em diferentes estádios fenológicos da soja no período vegetativo quando inoculada e/ou co-inoculada. O experimento foi conduzido em Marechal Cândido Rondon, Paraná, em condições de casa de vegetação. Os tratamentos foram: controle; inoculação de sementes com *Bradyrhizobium japonicum*; inoculação com *Azospirillum brasilense*; co-inoculação com *B. japonicum* via semente + *A. brasilense* via sulco e co-inoculação com *B. japonicum* via sulco + *A. brasilense* via semente. Avaliações foram realizadas nos estádios fenológicos V2; V4; V6 e V8, e as seguintes características foram determinadas, o número de nódulos, percentagem de nódulos viáveis, área foliar e massa seca de parte aérea, a taxa de assimilação líquida de CO₂, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂, eficiência do uso da água, eficiência intrínseca do uso da água e eficiência de carboxilação. A inoculação ou co-inoculação com *A. brasilense* eleva a nodulação, a viabilidade, a área foliar e a massa seca de parte aérea, porém não interfere na atividade fotossintética e transpiratória da soja. Entretanto, o uso de *A. brasilense* torna a planta mais eficiente no uso do CO₂, sendo notado que a nodulação ocasionada por *B. japonicum* causa um maior requerimento de CO₂, durante os estádios iniciais.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculação.

Growth and gas exchange in the vegetative period of soy inoculated with bacteria diazotrophic

ABSTRACT: Aimed to study the growth and gas exchange at different growth stages of soybean in the growing season when inoculated and /or co-inoculated. The experiment was conducted in Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brazil, under greenhouse conditions. The treatments were: control; inoculating seeds with *Bradyrhizobium japonicum*; inoculation with *Azospirillum brasilense*; co-inoculation with *B. japonicum* via seed + *A. brasilense* via groove and co-inoculation with *B. japonicum* via groove + *A. brasilense* via seed. Evaluations were performed at the phenological stages V2; V4; V6 and V8, and the following characteristics were determined, the number of nodules, percentage of viable nodules, leaf area and dry mass of shoots, net assimilation rate of CO₂, transpiration, stomatal conductance, internal CO₂ concentration, efficiency water use, intrinsic efficiency of water use and carboxylation efficiency. Inoculation or co-inoculation with *A. brasilense* increases nodulation, viability, leaf area and shoot dry weight, but does not interfere with photosynthetic activity and soybean transpiration. However, the use of *A. brasilense* makes the plant more efficient in the use of CO₂ being noted that nodulation caused by *B. japonicum* causes a greater application of CO₂ during the initial stages.

Keywords: *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, co-inoculation.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é a oleaginosa mais cultivada no mundo. O Brasil é responsável por 30% da produção mundial de soja (equivalente a 94,5 mil toneladas de soja em 2015) e ocupa a segunda colocação entre os países produtores, atrás apenas dos Estados Unidos (USDA, 2015).

Pertencente à família Fabaceae, a soja é originária de regiões tropicais e possui metabolismo C3 de assimilação de carbono,

e portanto, baixa eficiência fotossintética (CASAROLI et al., 2007). Devido ao seu potencial produtivo, a soja apresenta alta exigência em nutrição mineral, principalmente na demanda de nitrogênio, sendo necessários em torno de 80 kg ha⁻¹ para cada 1 Mg de grãos produzidos (HUNGRIA et al., 2001), proporcionando altos custos de produção. Adicionalmente, devido à alta necessidade do nitrogênio, a complementação do nutriente via adubação acarreta em elevados impactos ambientais (ANDRADE et al., 2009).

Por volta da década de 70, pesquisas na agricultura brasileira, identificaram bactérias associativas capazes de quebrar a tripla ligação entre os átomos de nitrogênio, transformando-o numa forma assimilável pelas plantas (FAGAN et al., 2007). Estudos realizados posteriormente, demonstraram que esta associação é capaz de suprir toda a demanda por nitrogênio na cultura da soja (HUNGRIA et al., 2001). Esse fato reduziu os custos de produção no sistema brasileiro, garantindo maior lucratividade com amenização dos impactos ambientais.

Estas bactérias, classificadas atualmente como *Bradyrhizobium japonicum*, associam-se com a soja através de simbiose (FAGAN et al., 2007). Esse processo é iniciado pela liberação de exsudatos radiculares, possibilitando atração quimiotática das bactérias. A associação acontece nos primórdios dos pelos radiculares, culminando na formação de nódulos (TAIZ; ZEIGER, 2013). O principal fator demandado é o maior consumo de CO₂, estimado em torno de 20%, devido a maior necessidade de produção de ATP na planta para a quebra da tripla ligação (KASCHUK et al., 2009).

A partir da concretização do uso de *B. japonicum*, novas bactérias foram estudadas para os mais diversos fins, com destaque para *Azospirillum brasilense*, inicialmente estudada para uso em gramíneas visando a redução do uso do nitrogênio. Todavia, trabalhos mostraram que essa bactéria possui melhor desempenho como promotora de crescimento vegetal, devido a estímulos na produção de hormônios vegetais tais como auxina (ácido 3-indolacético), ácido giberélico, citocininas, ácido abscísico, poliaminas (PERRIG et al., 2007).

Essa interação entre *A. brasilense* e o status hormonal causa alterações no sistema radicular como incrementos no comprimento e volume das raízes (DARTORA et al., 2013) e maior formação de pelos radiculares (CASSÁN et al., 2009), contribuindo para elevar o acúmulo de biomassa na parte aérea, além de alta produtividade (RODRIGUES et al., 2014).

Considerando os efeitos radiculares mediados pelo balanço hormonal junto ao conhecimento de iniciação do nódulo a partir do pelo radicular, estudos de co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* foram realizados em busca de uma combinação entre nodulação, maior suprimento de nitrogênio e aumentos na produção vegetal. Os resultados deste trabalhos indicaram que a co-inoculação entre essas espécies causam incrementos radiculares (CASSÁN et al., 2009; BULEGON et al., 2014), hormonais (CHOIX et al., 2014) e de suprimento de nitrogênio (FLORES et al., 2010).

Cabe ressaltar que Plazinski; Rolfe (1985) relataram que o uso de combinação de bactérias podem reduzir a atividade de colonização radicular. Posteriormente, Juge et al. (2012) comprovaram que o uso de três espécies de bactérias resultou em menores valores de nódulos. Portanto, esta interação de bactérias necessita de maiores evidências, elucidando os efeitos de sua utilização em relação aos processos fundamentais da planta. Desta forma, o presente estudo buscou estudar o crescimento e as trocas gasosas em diferentes estádios fenológicos da soja no período vegetativo quando inoculada e/ou co-inoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido, em casa de vegetação, na estação de cultivo protegido e controle biológico, Professor Dr. Mário César Lopes, situada na Universidade Estadual

do oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, e quatro repetições, sendo: T1 – controle não inoculado; T2 - inoculação de sementes com *Bradyrhizobium japonicum* (bactéria fixadora de nitrogênio – BFN); T3 - inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* (bactéria promotora de crescimento – BPC); T4 - co-inoculação, sementes com *B. japonicum* + *A. brasilense* via sulco e T5- co-inoculação, *B. japonicum* via sulco + *A. brasilense* via semente.

As avaliações biométricas e as trocas gasosas foram realizadas nos estádios fenológicos V2; V4; V6 e V8 (primeira, terceira, quinta e sétima folha trifoliolada completamente expandida, respectivamente), totalizando 80 unidades experimentais,

Como unidade experimental foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 3 dm³, ocupados com substrato solo proveniente de horizonte A de Latossolo Vermelho Eutroférico (EMBRAPA, 2013). O substrato foi autoclavado à 105°C e 1,5 atm.

O substrato possuía as seguintes características químicas: pH (CaCl₂): 5,24; P disponível (Mehlich⁻¹): 3,08 mg dm⁻³; K (Mehlich⁻¹): 0,28 cmol_c dm⁻³; Ca⁺² (KCl 1mol L⁻¹): 3,44 cmol_c dm⁻³; Mg⁺² (KCl 1mol L⁻¹): 1,52 cmol_c dm⁻³ e Al⁺³ (KCl 1mol L⁻¹): 0,00 cmol_c dm⁻³; H+Al (acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹): 3,82 cmol_c dm⁻³; SB: 5,24 cmol_c dm⁻³; V: 54,840% e uma população de 2 x 10⁶ UFC g⁻¹ de bactérias diazotróficas. Para a adubação com fósforo (P) e potássio (K) foram utilizados 150 mg dm⁻³ de K na forma KCl, 200 mg dm⁻³ de P na forma de superfosfato simples, e ainda, adicionou-se 170 mg dm⁻³ de Ca e 80 mg dm⁻³ de S.

As sementes da cultivar CD 202 Ipro[®], que apresenta hábito de crescimento determinado, foram inoculadas 30 minutos antes da semeadura. Para *B. japonicum* utilizou-se inoculante composto à base das Semia 5079 e 5080 em concentração de 5,0 x 10⁹ unidades formadora de colônia (UFC) mL⁻¹, adotando dosagem de 1 mL para 1 kg de sementes. Para inoculação com *A. brasilense*, utilizou-se inoculantes a base das estirpes AbV5 e AbV6 com concentração de 2,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹, sendo utilizado 2 ml para 1 kg de semente. Os mesmos inoculantes foram utilizados para aplicação via sulco, em dosagem correspondente à 600 mL ha⁻¹ diluídos em 100 L de água e aplicado via pulverização, sobre as sementes antes do fechamento do sulco, com auxílio de um pulverizador pressurizado com CO₂ (EMBRAPA SOJA, 2011). A semeadura foi realizada no dia 18/09/2015, de forma manual, com distribuição de cinco sementes por vaso, com posterior desbaste para uma planta por vaso, sendo as superfícies dos vasos recobertas com feno e irrigados diariamente conforme necessidade da cultura.

As avaliações foram realizadas conforme as plantas entravam no estágio fenológico estabelecido, seguindo padronização da Embrapa, ou seja, 50% das plantas mais uma no estágio fenológico desejado (EMBRAPA SOJA, 2011). Desta forma, em cada ponto de análise foram escolhidas quatro unidades experimentais de cada tratamento, totalizando 20 unidades experimentais por estágio fenológico. As avaliações em V2, V4, V6 e V8 foram efetuadas aos 20, 29, 41 e 52 dias após a semeadura (DAS), respectivamente. As avaliações biométricas foram destrutivas, sendo determinado o número de nódulos (NN) por contagem manual, enquanto que para determinação da percentagem de nódulos viáveis (NV) foram considerados todos os nódulos presentes por meio de colorimetria, no qual

realizou-se um corte transversal e pela observação da coloração interna, sendo considerados viáveis apenas os de coloração vermelha. A área foliar (AF) foi determinada com auxílio de integralizador fotoelétrico Area Meter (LI 3000), enquanto que a massa seca de parte aérea (MSPA) foi determinada através de secagem $65,0 \pm 3,0$ °C por 72 horas, em estufa de circulação forçada de ar, com posterior pesagem.

Para a determinação das trocas gasosas utilizou-se o equipamento IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-6400XT (*Licor Inc. Lincoln, NE*). As leituras foram realizadas entre 09h00min e 11h00min, em dias de céu aberto, amostrando duas folhas por planta, sendo estas completamente expandidas, fotossinteticamente ativas e sem lesões, localizadas no terço médio. As condições atmosféricas médias, observadas pelo IRGA no momento das avaliações são apresentadas na Tabela 1.

Determinou-se a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), taxa de transpiração da folha (E), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), além das seguintes relações: $WUE = A/E$; $iWUE = A/g_s$ e $Fc = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001), em que WUE corresponde à eficiência do uso de água, $iWUE$ é a eficiência intrínseca do uso de água e Fc a eficiência instantânea de carboxilação, considerando-se C_i no momento da avaliação.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e submetidos a análise de variância, e quando constatado diferenças significativas nos respectivos estádios fenológicos, os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011). Determinou-se ainda o coeficiente de correlação entre as variáveis.

Tabela 1. Condições atmosféricas durante a realização das medidas de trocas gasosas nos respectivos estádios fenológicos da cultura da soja.

Table 1. Atmospheric conditions during the course of gas exchange measurements in their phenological stages of soybean.

EF	Temperatura do ar (°C)	CO ₂ do ar (μmol mol ⁻¹)	DFFA (μmol m ⁻² s ⁻¹)
V2	38,14±0,80	408,25±5,54	1199,77±0,72
V4	39,42±0,11	386,60±2,30	1199,80±0,73
V6	37,72±0,46	357,71±6,75	1199,73±0,60
V8	24,67±0,04	388,56±1,06	1199,38±0,44

EF: Estádios Fenológicos; DFFA: Densidade de Fluxo de Fótons Fotossinteticamente ativo. V2: 08/10/2015; V4: 17/10/2015; V6: 29/10/2015; V8: 09/11/2015.

3. RESULTADOS

Observou-se que as variáveis biométricas não diferenciaram-se entre si apenas na avaliação realizada em V4 ($p > 0,05$). O número de nódulos e a massa seca de parte aérea apresentou variação em V2, V6 e V8, enquanto a porcentagem de nódulos viáveis foi significativa apenas em V8. Para a área foliar foram observados apenas efeitos em V2 e V8.

Ressalta-se que, mesmo autoclavando o solo, foi obtida uma população inicial de bactérias noduladoras (tratamento controle). As plantas controle apresentaram nódulos, porém em quantidade inferior aos demais tratamentos, com exceção de V4. Em V2, verificou-se que a inoculação isolada de *A. brasilense* via semente propiciou um incremento na nodulação da planta, sendo semelhante as co-inoculações. Já em V6 a inoculação de *A. brasilense* promoveu maiores médias de nodulação, sem diferenciação da inoculação de *B. japonicum* e da co-inoculação *A. brasilense* semente + *B. japonicum* sulco.

Quando se co-inoculou a semente com *B. japonicum* e aplicou-se *A. brasilense* no solo, em V6 foi verificada baixa nodulação, semelhante ao controle, sendo 29,14% e 40,09%, valores estes, inferiores aos obtidos com inoculações isoladas, respectivamente. O mesmo comportamento foi verificado em V8, sendo que nessa condição, a co-inoculação foi inferior em 46,75% em relação ao controle, que por sua vez, contava apenas com bactérias naturais do solo. Já a co-inoculação com *A. brasilense* na semente e *B. japonicum* no sulco promoveu a maior média, superando em 38,87% a inoculação com *B. japonicum* na semente, padrão utilizando atualmente na agricultura (Figura 1A).

Quanto a porcentagem de nódulos viáveis foi verificado que em V2 e V4 todos os nódulos contidos na planta possuíam capacidade de fixar nitrogênio. Em V8 os nódulos contidos no controle apresentam menor viabilidade, em relação a inoculação das sementes com *A. brasilense* e a co-inoculação das sementes com *B. japonicum* via sulco, com valores acima de 90% e 80%, respectivamente (Figura 1B).

A área foliar foi influenciada em V2, a ponto que as inoculações isoladas de *B. japonicum* e *A. brasilense* obtiveram as menores médias. Em V6 a menor média de AF foi obtida no controle, sendo que os demais tratamentos apresentaram médias semelhantes. A inoculação isolada e a co-inoculação com *A. brasilense* via semente, propiciaram AF superior em 33,58% e 38,02% ao controle e em 8,11 e 14,27% a inoculação com *B. japonicum* nas sementes, respectivamente (Figura 1C).

A massa seca de parte aérea em V2 mostrou que a inoculação de *B. japonicum* via semente limita o desenvolvimento inicial da cultura da soja, contudo sem limitar o desenvolvimento posterior, sendo semelhante ao controle nas demais fenofases. Em V6 e V8 os tratamentos que receberam *A. brasilense* via semente promoveram maiores médias de MSPA, seguindo as demais variáveis avaliadas. A inoculação via sementes isolada e a co-inoculação com *B. japonicum* via sulco, permitiram MSPA superior a inoculação clássica de *B. japonicum* na semente em 7,54% e 13,44% em V6, e 32,45 e 18,43% em V8, respectivamente.

Quanto as trocas gasosas, não foram observadas diferenças significativas para A e Fc em todas as fenofases avaliadas ($p > 0,05$). Para as demais variáveis fotossintéticas foram observados efeitos em pelo menos uma fenofase (Tabela 2). As formas de inoculação afetaram E em V2 e V4; g_s e $iWUE$ apenas em V4; e WUE em V2 ($p \leq 0,01$) e V8 ($P \leq 0,05$).

Na avaliação da taxa de assimilação líquida de CO_2 (Figura 2A) não foram observados efeitos significativos nos estádios fenológicos avaliados. A maior variação fotossintética apresentada entre o controle e os demais tratamentos ocorreu em V6, sendo 14,65% inferior quando comparado à média dos demais tratamentos com presença de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e promotoras de crescimento (BPC). Todos os tratamentos que receberam inoculação ou co-inoculação apresentaram comportamento semelhante quanto A , tendo em V4 e V6 pequena redução e elevação no V8.

Considerando os valores de E (Figura 2B), constatou-se em V2, que menores taxas transpiratórias ocorreram no tratamento controle, sendo 13,74% inferior a maior média, obtida com inoculação combinada de *A. brasilense* via semente + *B. japonicum* via sulco. Em V4 o comportamento foi oposto ao observado em V2. O controle promoveu maior E , 7,53% superior ao *A. brasilense* via semente + *B. japonicum* via sulco.

Tabela 2. Valores de quadrado médios baseado em variáveis biométricas e de trocas gasosas de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, em diferentes estágios fenológicos da cultura. Table 2. Value mean square based in variables biometric and gas exchange soybean plants to inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in different growth stages of the crop.

FV	GL	NN	NV	AF	MSPA	A	E	Ci	gs	WUE	iWUE	Fc
Estádio V2												
Tratamento	4	100,84**	-	40,62**	42,02**	0,29	1,53*	127,82	0,013	0,052**	26,33	0,000001
Resíduo	15	5,34	-	3,29	3,35	2,01	0,45	41,92	0,0132	0,008	18,17	0,000021
CV (%)		15,13	-	7,78	7,72	6,37	5,93	2,17	16,98	4,73	12,69	6,08
DMS		4,04	-	3,96	4,00	3,1	1,478	14,143	0,251	0,202	9,311	0,0099
Estádio V4												
Tratamento	4	231,55	-	22,26	28,03	5,62	0,56*	42,67	0,028*	0,013	17,64*	0,00006
Resíduo	15	131,36	-	13,80	18,82	2,23	0,14	22,97	0,006	0,01	5,03	0,000035
CV (%)		43,20	-	15,78	17,70	6,85	2,84	1,65	9,62	6,18	8,34	7,85
DMS		25,03	-	8,11	9,47	3,265	0,83	10,47	0,172	0,22	4,90	0,012
Estádio V6												
Tratamento	4	131,85*	101,65	235,82*	245,93*	35,66	5,17	771,78	0,028	0,09	533,79	0,0004
Resíduo	15	11,88	54,78	38,29	40,07	18,90	2,99	1103,17	0,027	0,10	599,36	0,0001
CV (%)		18,09	8,28	13,54	13,23	22,50	26,67	13,52	41,75	10,67	42,44	16,45
DMS		7,53	16,16	13,51	13,82	9,497	3,77	72,585	0,362	0,712	53,47	0,077
Estádio V8												
Tratamento	4	833,23**	607,73**	194,06	801,99**	5,45	0,46	2277,67*	0,0018	7,23*	798,50	0,0059
Resíduo	15	14,76	55,65	93,75	110,78	7,46	0,48	653,58	0,0052	1,94	2202,28	0,0026
CV (%)		10,24	9,94	11,00	11,05	10,22	22,94	16,60	31,28	15,65	35,93	28,02
DMS		8,39	16,29	21,14	22,98	5,968	1,521	55,83	0,158	3,04	102,499	0,112

**,:* : significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade respectivamente. Valores sem indicação não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. CV (%): coeficiente de variação; DMS: Diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5%. – indica que todos os nódulos estavam viáveis e não foi realizada a ANOVA.

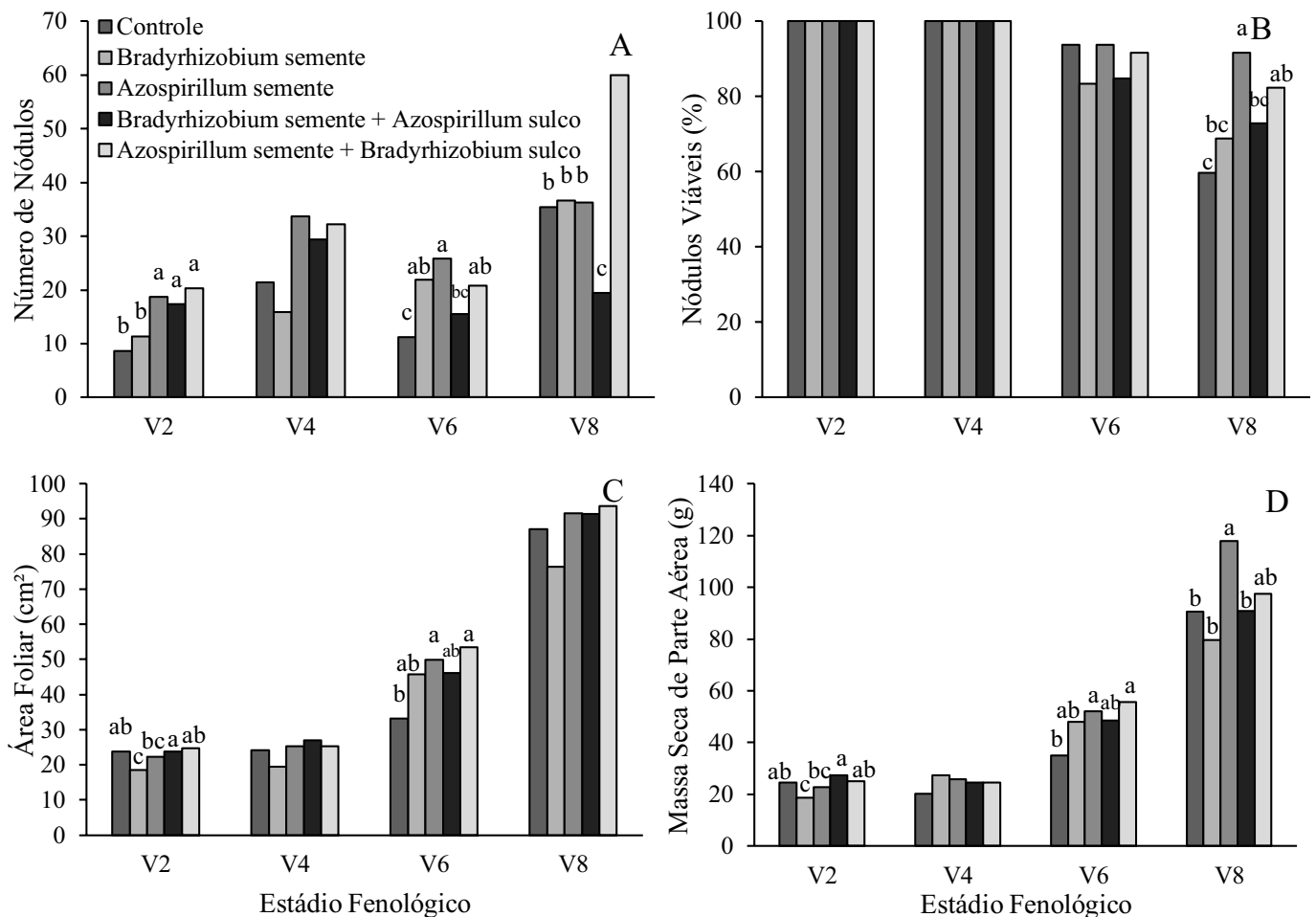


Figura 1. Variáveis biométricas de plantas de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* durante o período vegetativo da cultura. ** Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos em cada fenofase a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Figure 1. Biometric variables of soybean plants submitted inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* during the growing season of the crop. ** Different letters represent significant differences between treatments in each phenophase 5% error probability by Tukey test.

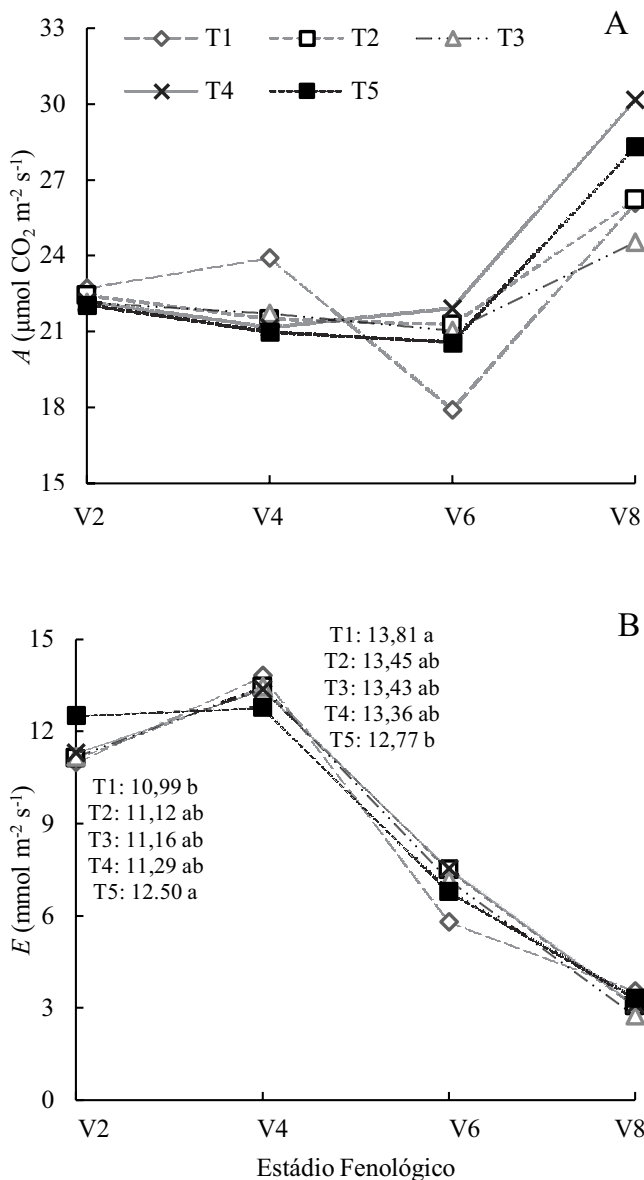


Figura 2. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) (A) e transpiração (E) (B) de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* durante o período vegetativo da cultura. ** letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Figure 2. Net assimilation rate of CO₂ (A) (A) and transpiration (E) (B) of soybean plants submitted inoculation and co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* during the growing period of the culture. ** Different letters represent significant differences between treatments in each phenophase 5% error probability by Tukey test.

Os demais tratamentos apresentaram resultados semelhantes em ambas as fenofases, não diferindo significativamente.

Encontrou-se reduções na condutância estomática a partir de V4 (Figura 3A), ou seja, as plantas limitaram suas perdas de água favorecendo uma melhor utilização desse recurso. A maior *g_s* para todos os tratamentos foi obtida em V4, onde o controle e a inoculação das sementes com *B. japonicum* promoveram maiores valores de *g_s*, sendo 24,17 e 20,69% superior a inoculação combinada de *A. brasilense* via semente + *B. japonicum* via sulco. Em V2 e V4, as plantas que receberam inoculação, fecharam seus estômatos antecipadamente, evitando

perdas elevadas de água durante o desenvolvimento inicial. Quando estas alcançaram maior desenvolvimento (V6 e V8), o comportamento foi contrário, as plantas mantiveram seus estômatos abertos durante maior período, e consequentemente atividade fotossintética elevada (Figura 2A).

Não foram encontradas diferenças significativas para a concentração interna de CO₂ nas folhas (Figura 3B) nos estádios V2, V4 e V6. Contudo, em V8, a inoculação isolada de *A. brasilense* promoveu reduções de 32,59 e 34,93% quando comparados com o controle e inoculação das sementes com *B. japonicum*, respectivamente. Por sua vez, a inoculação das sementes com *B. japonicum* promoveu aumentos de 3,47% em relação ao controle.

Constatou-se em V2, que a inoculação combinada de *A. brasilense* via semente + *B. japonicum* via sulco promoveu redução de 14,56% na eficiência no uso da água em relação ao controle, e de 11,1 e 12,0% quando comparado as inoculação isoladas de *A. brasilense* e *B. japonicum*, respectivamente.

No estágio V8, o controle e a inoculação com *B. japonicum* promoveram menores médias de *WUE*. Por sua vez a inoculação com *A. brasilense* elevou *WUE* em 22,9 e 21,64% quando comparado com o controle e a inoculação com *B. japonicum*, respectivamente. A maior *WUE* foi obtida na co-inoculação de *B. japonicum* via semente e *A. brasilense* via sulco, incrementando em 29,0 e 13,63% em relação as formas isoladas via sementes.

O comportamento da *iWUE* (Figura 4B) foi semelhante a *WUE*. Em V4 foram encontradas diferenças significativas, a co-inoculação de *A. brasilense* na semente + *B. japonicum* via sulco promoveu incremento de 12,08% frente ao controle. A menor média foi provida pela inoculação isolada de *B. japonicum*, enquanto os demais tratamentos obtiveram médias intermediária.

Os tratamentos não foram efetivos em promover variação estatística para a variável *Fc* (Figura 4C), embora no estágio V8 a inoculação com *A. brasilense* isolada na semente promoveu maior valor. Esse resultado relaciona-se com a menor *Ci* obtido para nesse tratamento (Figura 3B). A *Fc* manteve-se constante durante os estádios iniciais de desenvolvimento, elevando-se durante o V8, ou seja, quando a planta se aproximavam do período reprodutivo.

Foi observado correlação para as trocas gasosas da cultura da soja em V4, V6 e V8. Em V2 e V4 foi observada correlação negativa entre *Ci* e número de nódulos, em V8 foi verificada correlação positiva entre a MSPA com percentagem de nódulos viáveis (Tabela 3).

4. DISCUSSÕES

As menores nodulações obtidas para a inoculação com *B. japonicum* via semente podem ser explicadas pela competição entre as bactérias (PLAZINSKI; ROLFE, 1985), pois essas dependem de sítios de ligações presentes nas raízes - pelos radiculares (FAGAN et al., 2007). Desta forma, embora as concentrações de bactérias fossem elevadas, os locais para colonização das mesmas nas raízes eram limitados, perfazendo em menor nodulação. Por sua vez, quando a adição de *A. brasilense* via semente, estimulou a emissão de pelos radiculares (CASSÁN et al., 2009) e maior quantidade de sítios de ligações e nodulação (RODRIGUES et al., 2012), propiciando maior nodulação apenas com a população natural do solo.

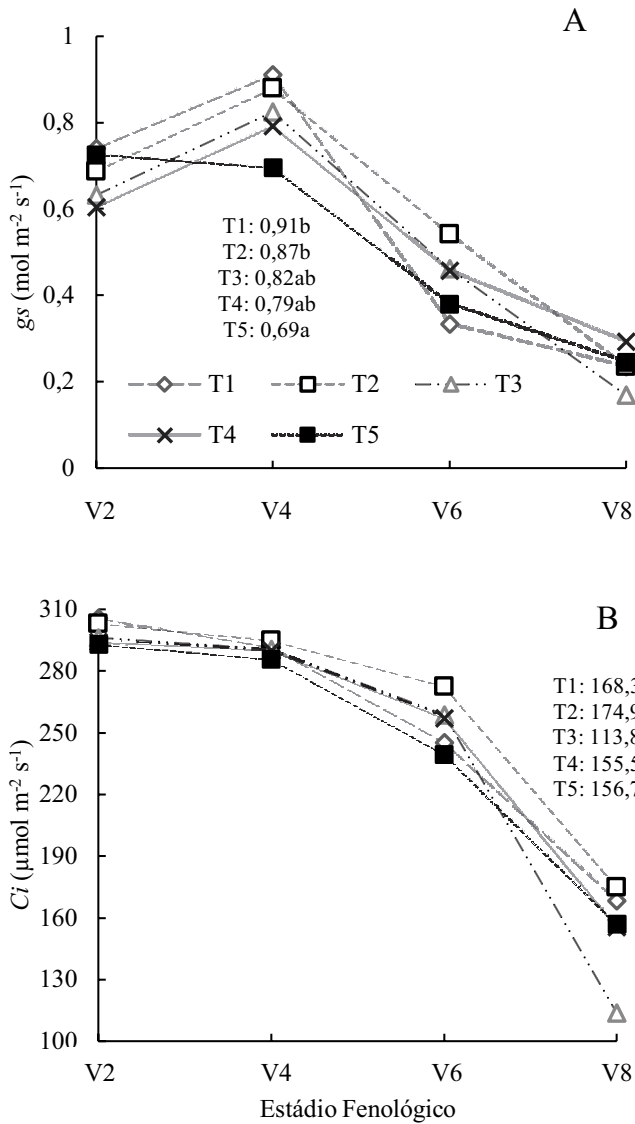


Figura 3. Condutância estomática (g_s) (A) e concentração interna de CO_2 (C_i) (B) de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, durante o período vegetativo da cultura. ** letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Figure 3. Stomatal conductance (g_s) (A) and internal CO_2 concentration (C_i) (B) of soybean plants submitted inoculation and co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* during the growing period of the culture. ** Different letters represent significant differences between treatments in each phenophase 5% error probability by Tukey test.

No tratamento controle ocorreu menor nodulação, visto que foi proveniente da população natural do solo. Essa redução pode ser consequência de duas condições, menores concentrações de bactérias quando comparado as inoculações com *B. japonicum* e menores sítios de ligações com a planta em relação as inoculações com *A. brasilense*. A mesma condição demonstrada anteriormente também se aplica na co-inoculação com *A. brasilense* na semente e *B. japonicum* via sulco, porém como a carga de bactérias no solo foi aumentada, observou-se aumento significativo no número de nódulos em V8.

Cabe ressaltar ainda que a nodulação também é modulada pelo nível hormonal na planta, e nessa condição quanto melhor o balanço e os níveis entre auxina e giberelina, mais eficiente será

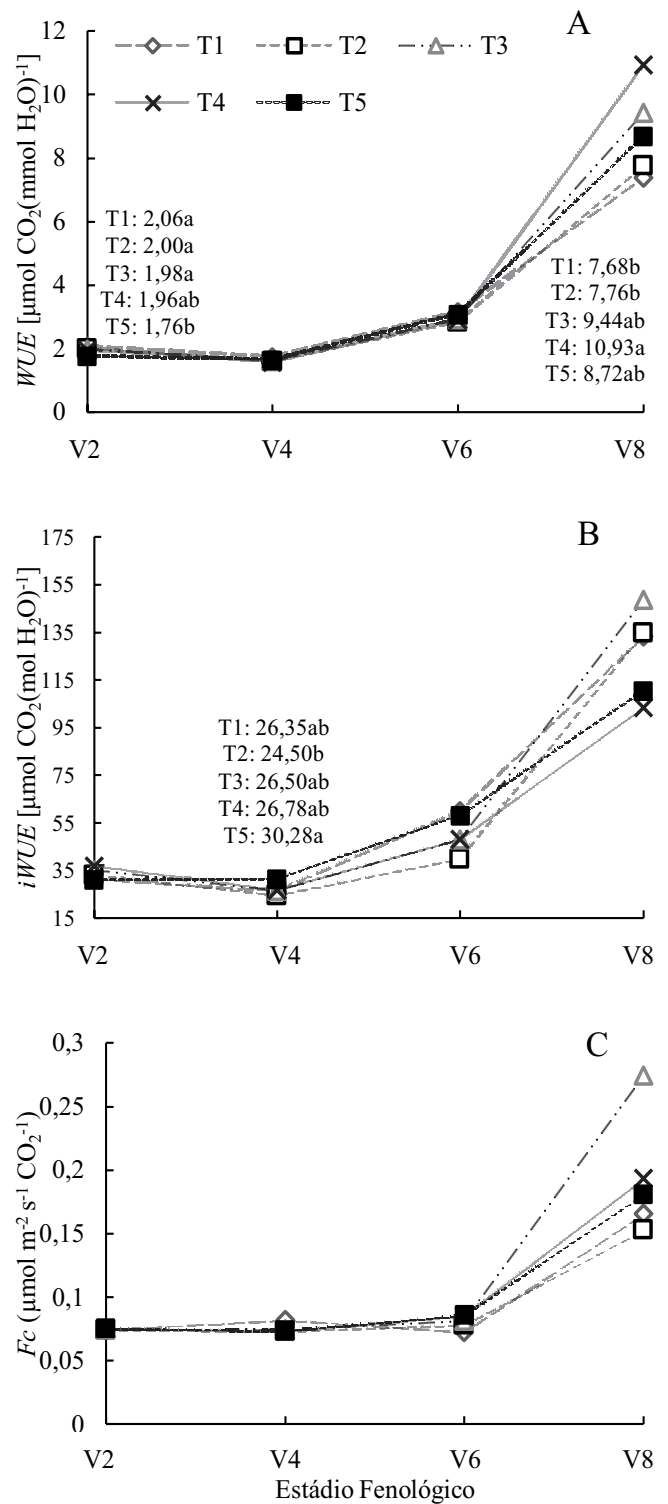


Figura 4. Eficiência do uso de água (WUE) (A), eficiência intrínseca do uso de água ($iWUE$) (B) e eficiência instantânea de carboxilação (F_c) (C) de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, durante o período vegetativo da cultura. ** letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Figure 4. Water use efficiency of (WUE) (A), intrinsic water use efficiency ($iWUE$) (B) and instantaneous carboxylation efficiency (F_c) (C) of soybean plants submitted inoculation and co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* during the growing period of the culture. ** Different letters represent significant differences between treatments in each phenophase 5% error probability by Tukey test.

Tabela 3. Correlação de Person, nos diferentes estádios fenológicos, para variáveis biométricas e de trocas gasosas de plantas de soja submetidas a inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.

Table 3. Pearson correlation in different stages phenological for variables biometric and gas exchange soybean plants to inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*.

EF	Variáveis	Correlação	Probabilidade (%)
V2	Ci x NN	-0,973	0,005
V4	E x gs	0,975	0,01
V4	Ci x NN	-0,795	0,10
V4	gs X Ci	0,879	0,04
V4	E x gs	0,975	0,01
V6	E x gs	0,880	0,02
V8	MSPA x NV	0,819	0,08
V8	Ci x Fc	-0,950	0,001

EF: Estádio fenológico. ** Exibidas as correlações com probabilidade $\leq 10\%$ de probabilidade de significância, pelo teste t.

a nodulação da planta. Portanto, como o *A. brasilense* possui a capacidade de estimular e excretar esses hormônios (KUSS et al., 2007), maior capacidade de nodulação. Essa forma de inoculação, utilizando-se semente e sulco de semeadura não limita a nodulação, o que ocorre quando se utiliza duas bactérias na semente (PLAZINSKI; ROLFE, 1985).

Resultados semelhantes ao presente foram revisados por Rodrigues et al. (2012) em relação co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus* sp. em feijão caupi, no qual o número de nódulos foi elevado e maior produção da planta foi alcançada. Araújo et al. (2010), também relataram em feijão caupi que a co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis* elevam a nodulação da planta e melhor aporte de nitrogênio para a mesma.

O uso de *A. brasilense* também elevou a manutenção da viabilidade dos nódulos em V8, podendo ser considerado como resposta a manutenção do fornecimento de assimilados para os nódulos, visto que as plantas que receberam esse tratamento apresentaram maior área foliar e massa seca de parte aérea, confirmado pela correlação MSPA x NV em V8.

O aumento na área foliar e massa seca de parte aérea provido pelo *A. brasilense* corrobora com os resultados de promoção de crescimento desempenhados por essa bactéria relatados em soja (CASSÁN et al., 2009; BULEGON et al., 2014), milho (REPKE et al., 2013) e trigo (RODRIGUES et al., 2014). O maior crescimento provavelmente decorreu da interação de fatores como o balanço hormonal (RADWAN et al., 2004), melhor utilização dos recursos produtivos como água e nutrientes pela maior exploração do solo pelo sistema radicular e conseqüentemente maior área de contato solo-planta. Além de maior eficiência das trocas gasosas como mostrado no presente estudo.

A taxa de fotossíntese líquida (Figura 2A) evidencia que inicialmente a demanda fotossintética da planta foi menor, elevando-se conforme aproximação do período reprodutivo, visto que a partir de V8 a planta iniciou seu florescimento. Contudo, os valores de *A* encontrados são inferiores aos relatados por Kaschuk et al. (2009), onde a inoculação com *Bradyrhizobium* resultou em taxa fotossintética entre 28 a 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mesmo com menor atividade, o desenvolvimento da cultura não foi comprometido e, que se desenvolveu adequadamente. Esperava-se que o tratamento controle promovesse menores taxas fotossintéticas, devido à ausência

de complementação nitrogenada por adubação mineral e/ou fixação biológica.

Quando plantas de soja recebem inoculação de bactérias como o *Bradyrhizobium*, o gasto energético do vegetal é elevado devido ao processo de fixação de nitrogênio representar alto custo energético, necessitando cerca de 16 ATPs para cada molécula de N_2 reduzida (TAIZ; ZEIGER, 2013), teoricamente demandando maiores taxas fotossintéticas. Porém, esse fato não foi verificado no presente estudo.

O uso da inoculação com *A. brasilense* não interferiu na fotossíntese, atrelado à sua ação de promoção de crescimento, não se dar pela elevação na fotossíntese, mas sim pelo melhor aproveitamento desses fotoassimilados.

O uso combinado de duas bactérias em plantas de soja mostram elevada eficiência no aproveitamento de fatores produtivos pela planta (FLORES et al., 2010; JUGE et al., 2012). Em ambos os trabalhos, a associação eleva a produção de compostos dependentes de carbono, como ureídeos e flavonoides. Os incrementos numéricos da fotossíntese (Figura 2A) para plantas co-inoculadas em V6 e V8 estão de acordo com os resultados observados por Kaschuk et al. (2009), que encontraram aumento de 14% na *A* em plantas inoculadas isoladamente com *Bradyrhizobium* e de 51% quando se realizou uma co-inoculação quando comparado ao controle.

Essa resposta deve-se a adaptação da planta de soja em conviver com organismos simbioses (Kaschuk et al., 2009). Especula-se que o aumento da taxa fotossintética em grandes valores ocorre em um único momento, apenas para sanar as reservas dos nódulos, e após esse ponto a taxa normal é retomada, não detectando-se diferenças significativas. Possivelmente, este momento ocorra no início da incidência da luz azul, culminando com o início da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A transpiração apresentou correlação positiva com a condutância estomática em V4 e V6 (Figura 2B e 3A), devido ao fechamento estomático reduzir as perdas de água. Como durante o ensaio o substrato não teve limitação de água, as plantas puderam expressar a máxima demanda transpiratória. Desta forma, quando as plantas foram inoculadas, a demanda de nitrogênio foi sanada via FBN, tendo maior capacidade de manter a absorção de água disponível no solo e manter seus estômatos abertos por um período maior, absorvendo água e possibilitando a entrada de CO_2 e manutenção da fotossíntese.

A superioridade em *E* (Figura 2B) no estágio V2 para os tratamentos que receberam o *A. brasilense* relaciona-se ao efeito de promoção de crescimento dessas bactérias, principalmente pelo incremento no sistema radicular (CASSÁN et al., 2009) e na formação de pelos radiculares (FERREIRA et al., 2014). Desta forma a planta consegue absorver mais água e manter a taxa de *E* elevada por um período mais prolongado, sendo de suma importância, visto que juntamente a água são absorvido nutrientes via fluxo de massa, como o nitrogênio e potássio, garantindo adequada nutrição (RUIZ et al., 1999). Cabe ressaltar que o potássio é responsável pela regulação osmótica da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013), fechando rapidamente os estômatos quando a transpiração é excessiva, mantendo a turgidez da planta.

A *gs* para o controle, foi numericamente maior em V4 e menor em V6 e V8, corresponde a maior perda de água nos estágios iniciais e limitação desta perda em estágios mais avançados. Este padrão evidencia melhor equilíbrio da planta

devido a inoculação, fechando os estômatos quando com pequena área radicular para exploração (V4), e quando essa área eleva-se, a manutenção de água é aumentada (V6 e V8). Deste modo, as plantas inoculadas mantêm-se fotossinteticamente ativas por maior período, não necessitando incrementar a taxa fotossintética por área.

A avaliação da C_i em estudos com inoculação é de suma importância, pois plantas colonizadas e noduladas com *B. japonicum* demandam cerca de 20% mais CO_2 , podendo gerar concorrência com a fotossíntese e demais funções (BUNCE, 2014; KASCHUK et al., 2009, 2012). Essa maior demanda de CO_2 foi encontrada no presente estudo (Figura 3B). Cabe ressaltar que a inoculação isolada de *A. brasilense* promove menor concentração interna de CO_2 , relacionado a não formação de nódulos de forma expressiva, reduzindo a demanda de CO_2 , enquanto o controle apresentou concentração de CO_2 semelhante ao *B. japonicum*. Contudo quando se observa as correlações obtidas entre C_i x NN evidencia que inicialmente o comportamento é oposto, e que a demanda de CO_2 dos nódulos inicia-se após seu estabelecimento.

Com base nos resultados, é possível inferir que plantas de soja inoculadas com *A. brasilense* alcançam taxas elevadas de fotossíntese com menores concentração de CO_2 dentro da câmara estomática. Esse fato é reforçado quando avaliado a co-inoculação, onde as plantas tiveram nodulação semelhante ou maior que *B. japonicum* isolado, necessitando de CO_2 interno próximo a 300 μmol . Desta forma, as plantas co-inoculadas tiveram uma concentração reduzida, cerca de 30 μmol na média geral, remetendo que o *A. brasilense* aumenta a eficiência da planta no uso do CO_2 .

Contudo, menores valores de C_i não podem ser considerados como condição indesejada, pois como a atividade fotossintética da planta não depende isoladamente dessa variável, esse resultado pode não ser negativo, como mostrado nesse trabalho.

Como os fatores estudados são positivamente correlacionados como demonstrado tem-se a estimativa que a co-inoculação das plantas de soja com *B. japonicum* + *A. brasilense*, independente da forma de aplicação, promove menor concentração interna de CO_2 , sem influência da abertura estomática.

Não houve redução da taxa fotossintética, mesmo com a diminuição da C_i , atribuído ao melhor aproveitamento dos fatores produtivos propiciados pela co-inoculação. Contrapondo resultados obtidos no presente estudo, Machado et al. (2005), estudando o comportamento fotossintético de Citrus, de aparato fotossintético C3 como a soja, cita que com a diminuição da C_i ocasionou redução de A .

Menores taxas de CO_2 interno podem representar menor atividade da enzima Rubisco (ribulose 1,5 bifosfato), levando a menor eficiência fotossintética da planta (BOWES, 1993). Porém esse fato não foi observado no presente estudo, e confirma-se no estudo conduzido por Verlag et al. (2001), estudando atividade fotossintética e da Rubisco em soja sobre condições de alta concentração de CO_2 e condições ambientes, onde encontrou-se variação.

A WUE e $iWUE$ (Figura 4A e 4B) são dois componentes importantes na quantificação da adaptação das plantas ao ambiente de cultivo que ela foi submetida. São características que demonstram o quanto a planta consegue utilizar da água absorvida e converte-la em biomassa vegetal. A maior resposta obtida na co-inoculação com *B. japonicum* via semente + *A. brasilense* via sulco é resultado do efeito combinado da

disponibilização de N via FBN pelo *B. japonicum* e promoção de crescimento via estímulos hormonais do *A. brasilense*.

O aumento da WUE e $iWUE$ de acordo com o desenvolvimento vegetal baseia-se na tolerância a alta taxa transpiratória demonstrado (Figura 2B) devido à baixa área foliar inicial para manutenção, buscando incorporar o máximo de nutrientes, mantendo a atividade fotossintética por mais tempo. Com a entrada em estádios mais avançados, as plantas contêm maior superfície foliar, passando a utilizar a água de forma mais efetiva. O menor valor obtido para o controle deve-se ao baixo crescimento, reduzindo a absorção de água.

A maior eficiência de carboxilação (Figura 4C) obtido para o *A. brasilense* utilizado de forma isolada comprova a especulação no estímulo a fixação de CO_2 por essa bactéria, mesmo em menores concentrações internas, comprovado pelo coeficiente de correlação entre C_i e F_c em V8 (Tabela 3). O presente resultado se opõe a vários trabalhos que relatam aumento da F_c está aliado ao incremento nos valores de C_i , como demonstrado em ecótipos de feijão cultivados em regiões semiáridas (FERRAZ et al., 2012) e salinas (SOUZA et al., 2011), e em diferentes espécies de Citrus (MACHADO et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

A inoculação ou co-inoculação com *A. brasilense* estimula a nodulação da cultura nos estádios que antecedem o período reprodutivo (V6 e V8), bem como eleva a viabilidade dos nódulos em V8, além de incrementar a área foliar em V6 e a massa seca de parte aérea em V6 e V8.

A inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* não afetam a taxa assimilatória líquida de CO_2 da soja.

Plantas não inoculadas tem menor tolerância a perda de água pela transpiração, e antecipam o fechamento estomático.

Inoculação e co-inoculação com *A. brasilense* promove melhor eficiência instantânea de carboxilação.

O uso de *A. brasilense* aumenta a eficiência na utilização do CO_2 .

6. AGRADECIMENTOS

A CAPES/PNPD, a Fundação Araucária de suporte ao desenvolvimento científico e tecnológico do Paraná, afiliada a Secretária Estadual de Ciência, Tecnologia e Educação Superior – SETI, ao INCT-FBN pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa produtividade concedida ao pesquisador Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. M. De; AQUINO, D. N. De; CRISÓSTOMO, L. de A.; RODRIGUES, J. D. O.; LOPES, F. B. Impacto da lixiviação de nitrato e cloreto no lençol freático sob condições de cultivo irrigado. *Ciência Floresta*, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 88-95, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000100014>
- ARAÚJO, A. S. F. De; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. De. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N_2 e o crescimento das plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000249>

- BOWES, G. Facing the Inevitable: Plants and Increasing Atmospheric CO₂. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v. 44, n. 1, p. 309-332, 1993. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.001521>
- 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*. **Jornal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. 1, p. 26-37, 2014.
- BUNCE, J. A. Limitations to soybean photosynthesis at elevated carbon dioxide in free-air enrichment and open top chamber systems. **Plant science**, Limerick, v. 226, p. 131-135, 2014.
- CASAROLI, D.; FAGAN, E. B.; SIMON, J.; MEDEIROS, S. P.; MANFRON, P. A.; NETO, D. D.; LIER, Q. de J. van; MULLER, L.; MARTIN, T. N. Radiação solar e aspectos fisiológicos na cultura de soja - uma revisão. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 102-120, 2007.
- 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**, Montrouge, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>
- CHOIX, F. J.; BASHAN, Y.; MENDOZA, A.; DE-BASHAN, L. E. Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 177, p. 22-34, 2014.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; PINTO JUNIOR, A. S.; CRUZ, L. M.; MENSCH, R. Influência do tratamento de sementes no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Ronodn, v. 12, n. 3, p. 175-181, 2013.
- EMBRAPA, **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília/ Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.
- 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.
- FERRAZ, R. L. de S.; MELO, A. S. de; SUASSUNA, J. F.; BRITO, M. E. B. de; FERNANDES, P. D.; JÚNIOR, E. da S. N. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 42, n. 2, p. 181-188, 2012.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, E. P. de B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.
- FLORES, P.; FENOLL, J.; HELLIN, P.; APARICIO-TEJO, P. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedling. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 335-340, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.009>
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.
- JUGE, C.; PRÉVOST, D.; BERTRAND, A.; BIPFUBUSA, M.; CHALIFOUR, F.-P. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 147-157, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.05.006>
- KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. a.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, n. 6, p. 1233-1244, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>
- KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. a.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N₂ fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 76, p. 1-6, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.002>
- 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**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>
- MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T.; MEDINA, C. L.; RIBEIRO, R. V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1161-1170, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005001200002>
- PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A.; CASSÁN, F. D.; LUNA, M. V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 5, p. 1143-1450, 2007.
- 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.
- RADWAN, T. E.S. E.D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 987-994, out. 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>
- REPKE, R. A.; JÚLIO, S.; CRUZ, S.; JORGE, C.; SILVA, D. A.; GONZALES, P.; JOSÉ, S. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 28, n. Suplemento 1, p. 196-202, 2012.
- RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; JUNIOR, A. S. P.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agrônomicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000100005>

- RUIZ, H. A.; MIRANDA, J.; CONCEIÇÃO, L. C. S. Contribuição dos mecanismos de fluxo de massa e de difusão para o suprimento de K, Ca e Mg e plantas de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 1015-1018, 1999.
- SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 587-592, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600003>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.
- USDA. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington D. C.: United States Department of Agriculture, 2015.
- VERLAG, F.; VU, J. C. V; GESCH, R. W.; PENNANEN, A. H.; ALLEN, L. H.; BOOTE, K. J.; BOWES, G. Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, n. 2, p. 295-307, 2001.
- ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature-Dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, Praga, v. 39, n. 3, p. 383-388, 2001.