**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Bioestimulantes “hidrolisado de proteína” e “extrato de algas” podem modular o metabolismo de nitrogênio em soja?

Daniele Caroline Hörz Engel

Dissertação apresentada para obter o título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2021**

Daniele Caroline Hörz Engel
Engenheira Agrônoma

Bioestimulantes “hidrolisado de proteína” e “extrato de algas” podem modular o metabolismo de nitrogênio em soja?

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO MAZZAFERA**

Dissertação apresentada para obter o título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Engel, Daniele Caroline Hörz

Bioestimulantes “hidrolisado de proteína” e “extrato de algas” podem modular o metabolismo de nitrogênio em soja? / Daniele Caroline Hörz Engel. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

49 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Ascophyllum nodosum* 2. *Glycine max* 3. Aminoácidos 4. Produtividade I. Título.

Ao meu esposo, Eduardo Engel,
por todo seu amor e companheirismo,
aos meus pais, Kurt M. Hörz e Lisane M. Hörz,
e ao meu irmão Thomas E. Hörz,
por serem minha base e
inspiração para realizar meus sonhos.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado a vida, me guiado e concedido sabedoria.

Ao professor Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação, oportunidade e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Ao técnico Edson Ademir de Moraes, pela amizade e auxílio nas análises laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário da Esalq, Mayara Rodrigues, João Leonardo Corte Baptista e Daniele Cristina Fontana, pela amizade e apoio durante o Mestrado, tornaram o trabalho mais alegre e leve.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Ângela M. D. Silva, pela colaboração.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo e ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de realizar meu Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2019/20211-2) pela bolsa de estudos concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 Delineamento experimental e tratamentos.....	15
2.2 Amostragens.....	16
2.3 Atividades enzimáticas.....	17
2.4 Compostos nitrogenados.....	18
2.5 Pigmentos fotossintéticos.....	19
2.6 Análise foliar de nutrientes.....	19
2.7 Componentes de rendimento.....	19
2.8 Análises estatísticas	19
3 RESULTADOS.....	21
3.1 Biomassa da planta, número e massa de nódulos.....	21
3.2 Atividades enzimáticas.....	22
3.3 Compostos nitrogenados.....	23
3.4 Pigmentos fotossintéticos.....	25
3.5 Análise foliar de nutrientes.....	25
3.6 Componentes de rendimento.....	26
3.7 Análise hierárquica de grupos.....	28
4 DISCUSSÃO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	39
MATERIAL SUPLEMENTAR 1.....	43

RESUMO

Bioestimulantes “hidrolisado de proteína” e “extrato de algas” podem modular o metabolismo de nitrogênio em soja?

Tratamento com bioestimulantes tem sido uma ferramenta no manejo de culturas agrícolas. Tem sido creditado à aplicação desses produtos aumento na assimilação de nutrientes e na qualidade dos produtos, e incremento na produtividade. A soja é uma das principais commodities no mundo, e sua produtividade é fortemente influenciada pela nutrição nitrogenada, que no Brasil, é suportada pela fixação biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos bioestimulantes hidrolisado de proteínas e extrato de algas *Ascophyllum nodosum* no metabolismo de nitrogênio em plantas de soja. Em casa de vegetação, plantas de soja tratadas com extrato de alga tiveram maior biomassa de folha e caule, enquanto o tratamento com hidrolisado de proteínas aumentou massa seca de raiz, em comparação as não tratadas. Os componentes do metabolismo de nitrogênio afetados significativamente foram aminoácidos na folha, aumentados com a aplicação foliar de extrato de alga, entretanto teores reduzidos de ureídeos foram encontrados na seiva do xilema com a aplicação dos bioestimulantes a base de extrato de alga e hidrolisado de proteínas. Todos os bioestimulantes testados aumentaram os componentes de rendimento da cultura, sendo a produção de grãos incrementada em até 28% com aplicação de extrato de alga. Os resultados encontrados sugerem que a produção de biomassa e a produção de grãos são estimulados com a aplicação bioestimulantes.

Palavras-chave: *Ascophyllum nodosum*, *Glycine max*, Aminoácidos, Produtividade

ABSTRACT

Can “protein hydrolyzate” and “seaweed extract” biostimulants modulate nitrogen metabolism in soybean?

Biostimulant treatment has been a tool in crop management. The application of these products has been credited with increasing nutrient assimilation and product quality, and increasing productivity. Soy is one of the main commodities in the world, and its productivity is strongly influenced by nitrogen nutrition, which in Brazil is supported by biological correction. The aim of this study was to evaluate the influence of protein hydrolyzate biostimulants and algae extract *Ascophyllum nodosum* on nitrogen metabolism in soybean plants. In the greenhouse, soybean plants treated with algae extract have higher leaf and stem biomass, while the protein hydrolyzate treatment increased root dry mass compared to untreated ones. The components of complete nitrogen metabolism affected were amino acids in the leaf, increased with a foliar application of seaweed extract, however reduced levels of ureides were found in the xylem sap with the application of biostimulants based on seaweed extract and protein hydrolyzate. All tested biostimulants increased crop yield components, with grain production being increased by up to 28% with the application of algae extract. The results found results that biomass production and grain production are stimulated with the application of biostimulants.

Keywords: *Ascophyllum nodosum*, *Glycine max*, Amino acids, Productivity

1. INTRODUÇÃO

O Nitrogênio (N) é o nutriente que a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) necessita em maior quantidade, chegando a 14 kg de N.Kg⁻¹ de grãos produzidos (Tamagno et al., 2017). Este nutriente é constituinte de aminoácidos (AA), proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas, atuando em diferentes processos fisiológicos da planta (Taiz et al., 2017). O N é essencial para o desenvolvimento da cultura da soja e sua deficiência causa redução na capacidade de produção de grãos (Cafaro La Menza et al., 2019).

O N é absorvido pelas raízes das plantas na forma de nitrato (NO₃⁻), que no citoplasma é reduzido a nitrito pela enzima redutase de nitrato (RN). O nitrito é então reduzido a amônio e este é rapidamente assimilado em AA pelos sistemas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) no cloroplasto (Taiz et al., 2017). Na soja o suprimento de N se dá principalmente pela fixação biológica por meio da relação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Geddes e Oresnik, 2016). Estas se fixam nas raízes da planta formando nódulos e reduzem o nitrogênio atmosférico (N₂), fornecendo-o à planta em forma de amônia, em troca de fotoassimilados para sua sobrevivência.

Quando o N, na forma de amônia, é provido pela fixação simbiótica ele é fixado em compostos chamados ureídeos, alantoína e ácido alantóico, que são exportados para o resto da planta via xilema. Para o N dos ureídeos ser usado para a formação de outros compostos, eles são metabolizados em xantina, que é degradada, resultando em glioxilato e ureia. A ureia é metabolizada em amônia por ação da urease, sendo incorporada em AA e posteriormente em proteínas (Thomas e Schrader, 1981). Concentrações altas de ureídeos no xilema de leguminosas tropicais estão associadas a altas taxa de fixação de N₂ e nodulação efetiva, podendo ser usado como indicador da eficiência da fixação de N₂ (Alves et al., 2000).

A absorção de elementos essenciais pelas plantas, como o N, pode ser favorecida com a aplicação de bioestimulantes de plantas (PB) (Colla et al., 2015; Pascale et al., 2017). Este efeito, além da capacidade de melhorar a fertilidade do solo, promover o crescimento de plantas e reduzir o uso de produtos químicos no manejo de culturas tornam os PB uma opção para aumentar a sustentabilidade da produção agrícola (Halpern et al., 2015; Van Oosten et al., 2017; Win et al., 2018). Contudo, inúmeros fatores ainda afetam a estabilidade no uso de PB, como por exemplo a origem, o processamento, a espécie utilizada, modo e época de aplicação, e a espécie de planta tratada (Marinho-Soriano et al., 2006; Castro et al., 2019; Shukla et al., 2019), o que destaca a importância de um maior número de pesquisas visando estabelecer e compreender o uso destes e seus efeitos.

Segundo o Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulantes (EBIC), PB são produtos que contêm substância(s) e/ou microrganismos cuja função, quando aplicada às plantas ou à rizosfera, é estimular processos naturais para melhorar/beneficiar a absorção de nutrientes, eficiência do uso nutrientes, tolerância ao estresse abiótico e qualidade da cultura (EBIC 2013, <https://biostimulants.eu/>). PB podem ter material de origem variada, podendo ser de materiais biológicos e inorgânicos, de fermentação microbiana de matérias primas animais ou vegetais, substâncias húmicas, extrato de algas, hidrolisados de proteína, resíduos industriais, entre outros. Estes produtos bioestimulantes apresentam em sua composição uma mistura de carboidratos, fitohormônios, AA, que lhe conferem os efeitos bioestimulantes (du Jardin et al., 2020).

Os dois grupos de PB mais utilizados em plantas cultivadas são os extratos de algas (EA) e os hidrolisados de proteínas (HP) (Battacharyya et al., 2015; Colla et al., 2017). As algas fazem parte do ecossistema costeiro marinho, sendo as algas marrons a segunda espécie mais abundante, assim como, são as mais utilizadas na agricultura (Blunden & Gordon, 1986). A espécie *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis é a dominante na costa marinha do Atlântico Norte (Taylor, 1957; Craigie, 2011) e a mais estudada. Além dela, outras como *Sargassum* spp., *Fucus* spp., *Turbinaria* spp. e *Laminaria* spp., também são utilizadas como PB na agricultura (Hong, Hoang, & N. Son, 2007). EA contêm fitohormônios, como auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico e poliaminas, compostos semelhantes a hormônios como a betaína, polissacarídeos como laminarina, fucoidan e alginato, e também nutrientes (du Jardin et al., 2020). Em brócolis (*Brassica oleracea* var. itálica), o tratamento em casa de vegetação, com EA *Durvillaea potatorum* e *A. nodosum* aumentou sua área foliar, diâmetro de caule e biomassa. Além de, em campo, o tratamento com os PB também apresentar maior número de folhas, bem como maior diâmetro de caule e maior área foliar (Mattner et al., 2013). Kulkarni et al. (2019) encontraram maior número de folhas e maiores teores clorofila, proteínas e fitohormônio em folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) com aplicação de EA *Eklonia máxima* (Kelpak) em casa de vegetação.

Outro tipo de PB, os hidrolisados de proteína, são misturas de AA que são obtidos por hidrólise química ou enzimática de proteínas de resíduos agroindustriais, resíduos de culturas vegetais, ou de animais, como colágeno e tecidos epiteliais (Halpern et al., 2015). A composição dos HP varia de acordo com o material de origem e a hidrólise realizada, mas no geral, apresentam altos teores de AA como, alanina, arginina, glicina, prolina, glutamina, entre outros (du Jardin et al., 2020). HPs apresentam efeito bioestimulante em frutos como morango, laranja, banana, maçã e tomate, aumentando teores de proteínas, AA, sólidos

solúveis totais e vitaminas, tamanho dos frutos, melhorando a qualidade dos frutos, além de incrementar a produtividade (Rodrigues et al., 2020). Em plantas de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Corvina) de 24 anos de idade, a aplicação de PHs obtidos por hidrólise enzimática de resíduos orgânicos de soja, tremço e caseína (mistura de laticínios), expressou teores maiores de sólidos solúveis totais, melhorando a qualidade dos frutos. Os tratamentos com PHs também reduziram o índice de estresse relativo a condutância estomática das plantas de uva, demonstrando que PHs melhoram a capacidade da planta em resistir a estresses hídricos (Boselli et al., 2019).

Em soja, pesquisas têm destacado os efeitos de EA e PB à base de AA e lignina, sobre a germinação de sementes, estresse hídrico, aumento no acúmulo de nutrientes e também aumento na produtividade (Rathore et al., 2009; Anisimov e Chaikina, 2014; Martynenko et al., 2016; Shukla et al., 2018; Campobenedetto et al., 2020; do Rosário Rosa et al., 2021). Kocira et al. (2019) trataram plântulas de soja com EA *E.máxima* (Kelpak) 0,7% e 1%, em aplicação foliar única ou dupla, que resultou em plantas mais altas, com maior número de vagens, número de grãos e produção de grãos em todos os tratamentos, e ainda, com aplicação única na concentração de 1% do extrato as plantas apresentaram maiores teores de compostos antioxidantes; os autores concluíram que o maior crescimento das plantas deve-se à presença de reguladores de planta no PB, principalmente citocinina, giberelina, auxinas, poliaminas e brassinosteroides, embora que estes compostos estejam presentes em baixa concentração. A maior atividade antioxidante, que está relacionada com a capacidade de defesa da planta a estresse biótico e abióticos, ocorrem devido a presença de fitohormônios, AA, proteínas ou fenóis no composto.

Estudo feito no Canadá, realizou o tratamento de plantas de soja com PB à base *A. nodosum* (Acadian) testando seus efeitos sobre o estresse hídrico nas plantas (Shukla et al., 2018). O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com luz artificial e temperatura controlada, e as plantas tratadas no início do período vegetativo. O tratamento com Acadian apresentou plantas com menor murchamento após o estresse hídrico além de maior capacidade de reestabelecimento da turgescência, as plantas também apresentaram maior condutância estomática, comprovados pela maior expressão de genes reguladores de ácido abscísico (ABA), maior capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) também foi encontrada, corroborada com a expressão de genes responsáveis por remover ROS durante o estresse e genes que retardam a senescência.

Muitos dos trabalhos sobre PB realizados com soja avaliam as respostas da cultura quando expostas a situações de estresse, principalmente hídrico, porém ainda há uma lacuna sobre os

efeitos da aplicação de PB na cultura da soja, em geral, como também efeito específico sobre o metabolismo de N. O aumento da taxa de assimilação de N pela planta de soja tende a elevar sua produtividade, dado que o número de grãos está diretamente relacionado com o número de vagens retidas, e essas dependem da disponibilidade de N no período de floração (Thibodeau e Jaworski, 1975). Neste cenário, a aplicação de PB pode ser usada como fonte de recurso visando obter maiores produtividades por meio do aumento da eficiência do metabolismo de N.

Em plantas de canola (*Brassica napus* L. var. oleífera) a aplicação de EA (*A. nodosum*) influencia no metabolismo de N, aumentando a assimilação de nitrato (Jannin et al., 2013). Da mesma forma que o EA, foi mostrado que HP aumenta a absorção de N em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e milho (*Zea mays*), devido as maiores atividades das enzimas RN e GS (Ertani et al., 2009; Colla et al., 2014a). No entanto, o metabolismo de N em soja na presença destes PB não foi profundamente explorado, dificultando a compreensão do efeito de PB neste metabolismo e sua contribuição no aumento da produtividade.

Levando em consideração a diferença entre os conceitos de mecanismo e modo de ação, pode-se dizer que pouco se sabe sobre o modo de ação dos PB nas plantas (Yakhin et al., 2017), informações estas que, segundo Del Buono (2021), podem ser encontrados em estudos de bioquímica e com tecnologias moleculares. Até então, vários trabalhos com PB focam no mecanismo de ação destes produtos, encontrando efeitos sobre a produtividade, crescimento de plantas e absorção de nutrientes (Shekhar et al., 2012; Yakhin et al., 2017). Devido aos efeitos conhecidos de PB sobre estresse em plantas, muito se tem mostrado sobre ROS e a atividade de enzimas envolvidas no processo antioxidante, porém pouco é dito sobre quais compostos presentes nos PB são responsáveis por estas mudanças, e como estas são controladas (Rodrigues et al., 2020). Para se entender o modo de ação de PB estudos futuros devem abranger o fracionamento dos componentes de PB, isolados ou em combinação, e submeter a análises genéticas para identificar genes marcadores das respostas encontradas após o tratamento com PB (De Saeger et al., 2020).

Avanços têm sido encontrados para o aprimoramento na utilização de PB em plantas. Em recente pesquisa, utilizou-se tecnologias “ômicas” para a avaliação eficiente dos efeitos de HP sobre plantas de tomate. Nesta pesquisa Paul et al. (2019) empregaram o uso de análises de fenotipagem e metabolômica em plantas de tomate tratadas com HP à base de proteína de grãos de *Leguminosae* e *Brassicaceae*. Resumidamente, pode-se dizer que o emprego destas análises permitiu esclarecer que a ação de reguladores de crescimento juntamente com compostos antioxidantes pode ter afetado as vias de sinalização mediadas por ROS. Estes

resultados assinalam o uso potencial destas tecnologias, que facilitam a descoberta dos compostos com propriedades biostimulantes nestes produtos.

Em virtude de pouco se saber sobre os efeitos da aplicação de PB na cultura da soja, levando em consideração a importância econômica e social dessa cultura no mundo, e o crescente mercado de PB, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos bioestimulantes hidrolisado de proteínas e extrato de algas no metabolismo de nitrogênio em plantas de soja noduladas e na sua produtividade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo (22°42’S, 47°30’W). O clima da região, conforme classificação de Köppen, é do tipo Cwa (Alvares et al., 2013).

A soja cv. Intacta RR2 Pro 57HO123 TP IPRO (HO-Genética) foi semeada em vasos na segunda quinzena do mês de outubro nos anos de 2019 e 2020. Foram utilizadas 3 sementes por vaso, sendo feito o desbaste quando atingiram o primeiro par de folhas unifolioladas, restando uma planta por vaso. As sementes foram inoculadas logo após a semeadura com o inoculante Masterfix® L Soja (*Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*), na dose de 300 ml.ha⁻¹. Os vasos de 10 L continham mistura de solo, substrato orgânico peneirado (para jardinagem) e vermiculita (2:1:1, v/v/v). Semanalmente as plantas foram regadas com 200 ml de solução nutritiva segundo Hoagland e Arnon (1950), solução 2, contendo todos os nutrientes, exceto N. As plantas foram irrigadas por gotejamento. A proteção contra pragas e doenças foi feita, quando necessária, conforme se recomenda para a cultura da soja (EMBRAPA, 2013).

Foram testados dois modos de aplicação dos produtos, o tratamento das sementes e a aplicação foliar: 1) hidrolisado de proteína, produzido por digestão ácida (HCl) da proteína X (tanto o procedimento de digestão como a proteína não são revelados porque o procedimento será patenteado), na concentração de 0,2%; 2) extrato de alga *A. nodosum* da empresa Acadian, nas concentrações de 0,25 e 0,50%. Composição do EA: N – 8,12 g kg⁻¹; P – 6,82 g kg⁻¹; K – 12,00 g kg⁻¹; Ca – 1,60 g kg⁻¹; Mg – 2,03 g kg⁻¹; S – 8,16 g kg⁻¹; B – 5,74 mg kg⁻¹; Cu – 13,60 mg kg⁻¹; Fe – 11,5 mg kg⁻¹; Mn – 0,04 mg kg⁻¹; Zn – 24,40 mg kg⁻¹ e Na - 20 mg kg⁻¹; hidróxido de potássio, com 61,48 g L⁻¹ de K₂O solúvel em água; 69,60 g L⁻¹ de carbono orgânico total; e densidade de 1,16 g dm⁻³.

O tratamento de sementes foi realizado juntamente com a inoculação, sendo utilizado 1 ml por vaso sobre as sementes semeadas. A aplicação foliar foi feita com pulverizador pressurizado a CO₂, bico tipo leque e com pressão de 2 bar, nas plantas nos estádios V3 e V5. As soluções de pulverização foram preparadas com adição do adjuvante Rizospray (Rizobacter) na concentração 0,05%, um antievaporante e tensoativo com formulação que inclui organosilicones e óleo vegetal refinado modificado. As plantas foram alinhadas sobre uma bancada e a aplicação feita sobre as folhas, com uma passada contínua de ida e de volta, evitando escorrimento nas folhas, volume de 2 ml planta⁻¹. O substrato no vaso foi coberto

com papel toalha para evitar contaminação do solo. Para cada tratamento foram feitas seis repetições.

2.2. Amostragens

No primeiro ano a coleta das amostras para as análises foi realizada no estágio R5.1 da cultura. Primeiramente foram coletadas folhas para a dosagem da redutase do nitrato (RN), a mais nova folha totalmente expandida de cada planta foi coletada, colocadas em sacos plásticos e levadas em laboratório em isopor com gelo, onde seguiu-se com a análise. No dia seguinte, foram coletados os dois trifólios mais novos recém expandidos de cada planta para as análises enzimáticas e bioquímicas em laboratório, as amostras foram colocadas em saco plástico e transportadas em isopor com gelo até o laboratório. Folhas utilizadas na análise enzimática foram congeladas, e as utilizadas em análises bioquímicas foram liofilizadas e moídas em moinho analítico, e então congeladas, ambas em freezer (aproximadamente -10°C).

Para coleta da seiva do xilema, as plantas na casa de vegetação foram regadas abundantemente e no dia seguinte, entre as 8 e 10 horas, foi feita a coleta da seiva (Souza et al., 2016). Com o auxílio de uma tesoura de poda foi realizado um corte logo abaixo do nó cotiledonar das plantas, separando a parte aérea das raízes. Em seguida na região do corte foi realizado um corte mais preciso com uma lâmina, e a região foi lavada com água milliQ e enxugada com papel absorvente. A coleta da seiva que se acumulava no local do corte foi feita com o auxílio de pipeta. As amostras foram coletadas até se ter um volume de ao menos 0,5 ml de seiva. Durante a coleta as amostras eram depositadas em tubos Eppendorf que permaneceram em banho no gelo. Após a coleta, o material foi guardado em freezer (aproximadamente -10°C).

As folhas restantes, caule e pecíolos da parte aérea foram separadas em sacos de papel e secas em câmara de fluxo contínuo de ar quente por 72 horas a 70°C, e posteriormente pesadas. Com auxílio de água corrente, as raízes foram coletadas intactas dos vasos e lavadas. Elas foram colocadas em sacos plásticos e, em laboratório, para quatro repetições, os nódulos foram contados, separados e secos em estufa 70°C para determinação da massa seca. Com os dados de número de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta, foi calculada a massa seca média por nódulo. As raízes foram secas em câmara de fluxo contínuo de ar quente por 72 horas a 70°C, e posteriormente pesadas.

2.3. Atividades enzimáticas

Para a dosagem da redutase do nitrato foram utilizadas a mais nova folha totalmente expandida de cada planta (Foy e Fleming, 1982), como descrito anteriormente. Com uma tesoura, foram cortados segmentos de 1 mm de largura da parte central da folha, mas sem a nervura central, pesando aproximadamente 100 mg, que foram colocados em erlenmeyer de 50 ml com 10 ml de meio de incubação (K_2HPO_4 0,05M pH 7,5 + KNO_3 0,05M + propanol 1%) e infiltrados sob vácuo. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a 30°C por 60 min, no escuro. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 100 μ l, que foi misturada com 100 μ l de sulfanilamida 1% em HCl 1,5N e 100 μ l N-naftiletilenodiamino-2HCl 0,02% em H_2O . A concentração de nitrito foi determinada em espectrofotômetro $\lambda=540$ nm. A atividade da enzima RN foi expressa em ng de NO_2^- mg^{-1} de massa fresca h^{-1} .

Para análise da enzima glutamina sintetase e glutamato sintase as amostras de folhas congeladas foram extraídas em politron com 15 ml de tampão de extração: 100mM Tris-HCl, 1mM EDTA e 1mM DTT, em pH 7,8. Em seguida as amostras foram centrifugadas 10.000 rpm por 15 min a 4°C e 2,5 ml do sobrenadante foram filtrados em colunas Sephadex G25 PD10 (GE Life Science) com tampão 50mM Tris-HCl e 1mM EDTA (pH 7,8). O teor de proteína no extrato filtrado foi determinado com reagente de Bradford pronto para uso da BioRad (Bradford, 1976). A concentração de proteína foi expressa em relação a curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA).

A determinação da enzima GS foi realizada segundo Rhodes et al. (1975). A reação continha 400 μ l do meio de reação (50 mM Tris-HCl, 20 mM $MgSO_4$, 80 mM L-glutamate, 30 mM hidroxylamine e 24 mM ATP, pH 7,8) e 500 μ l do extrato proteico. A reação foi incubada a 30°C durante 30 min e, em seguida, 0,5 ml de reagente $FeCl_3$ (370mM $FeCl_3$ e 670mM HCl) foi adicionado e a absorbância determinada a $\lambda=535$ nm. Os dados foram expressos em Δ Absorbância. μ g proteína $^{-1}$. h^{-1} .

A análise da atividade da GOGAT foi determinada segundo (Dougall, 1974). A mistura de reação continha 1250 μ l com 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM L-glutamine, 5 mM ácido α -cetoglutárico e 0,1mM NADH e 250 μ l do extrato proteico. A reação foi incubada a 30°C por 30 min, sendo em seguida adicionado 250 μ l de H_2SO_4 5%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em $\lambda=340$ nm. Os dados foram expressos em Δ Absorbância. μ g proteína $^{-1}$. h^{-1} .

2.4. Compostos nitrogenados

As folhas para as análises foram coletadas, liofilizadas e moídas, e a seiva do xilema coletada, como descrito anteriormente. Para fazer o extrato, foram adicionados 1,5 ml de etanol 5% às amostras de folha moídas, estas foram agitadas a cada 30 min durante 2h em agitador vortex, e então centrifugadas durante 15 min a 12000 rpm, 750µl de sobrenadante foram colocados em tubos Eppendorf e acondicionados em freezer. Para análise de nitrato na seiva do xilema as amostras de 1ml de seiva foram liofilizadas, para concentração do composto.

A determinação de NO_3^- foi executada conforme método de Cataldo et al. (1975). Foram adicionados em tubo de ensaio 50 µl da amostra (para seiva o material liofilizado), 50 µl de água Milli Q, 200 µl de ácido salicílico 5% em H_2SO_4 concentrado. Os tubos foram agitados e permaneceram em repouso durante 20 min. Em seguida, foram adicionados aos tubos 4,75 ml de 2N NaOH, e após agitação foram deixados resfriar no ambiente, antes da absorbância ser determinada em espectrofotômetro $\lambda=410$ nm. Os teores de nitrato são expressos em µg de $\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca, e em µg de $\text{NO}_3^- \text{ µl}^{-1}$ de seiva.

A dosagem de AA livres totais foi realizada seguindo a metodologia de (W. Yemm et al., 1955), para amostras de folha e exsudato do xilema. Para folha, foram adicionados 500 µl de amostra em tubos de ensaio, para seiva adicionou-se 20 µl de amostra, completados com 480µl de água Milli Q, 250 µl de tampão citrato 0.2M pH 5,0, 100 µl de ninhidrina 5% em metil-celulose e 500 µl de KCN 0,2 M em metil-celulose (preparado a partir de uma solução 0,01M de KCN em água). A mistura foi colocada em banho-maria a 100°C por 20 min, tampando os tubos com bolas-de-gude. Após estarem resfriadas adicionou-se às amostras 500 µl de EtOH 60%, e após agitação foram feitas as leituras de absorbância espectrofotômetro $\lambda=570$ nm. A curva padrão para determinação dos AA foi feita com leucina (0-100 nmoles.ml⁻¹) e os dados expressos em nmol eq. leucina. g⁻¹ MS, e em nmol eq. leucina. ml⁻¹ para seiva.

A determinação dos ureídeos totais da folha e exsudatos de xilema foi realizada conforme método de (Vogels e Van Der Drift, 1970). Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µl de amostra diluídos, 500 µl de água Milli Q, 250 µl de NaOH 0,5 N, 20 µl de fenilhidrazina 0,33%. Os tubos foram colocados fechados com bolas de vidro em banho-maria a 100°C por 8 min. Após resfriados no ambiente foram adicionados aos tubos 250 µl de HCl 0.65 N, e colocados novamente em banho-maria a 100°C durante 4 min. Em seguida, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e receberam 250 µl de tampão fosfato 0,4M pH 7,0 e 250 µl de fenilhidrazina 0,33%, foram deixados em descanso por 10 min e colocados em banho de

gelo por mais 5 min. Nos foram então adicionados 1,25 ml de HCl 12 N concentrado e gelado, agitados e adicionados 250 µl de ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,65 %. Os tubos foram agitados e após 15 min foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro $\lambda=535$ nm. Os teores de ureídeos foram determinados a partir de curva padrão com alantoína e os dados expressos em nmol de ureídeos. g⁻¹ MS, ou por ml de seiva do xilema.

2.5. Pigmentos fotossintéticos

A dosagem de clorofilas a (Ca), Clorofila b (Cb), a+b (Ctot) e carotenoides foram realizadas a partir de solução extratora de dimetilsulfóxido (DMSO), com base na metodologia de (Hiscox e Israelstam, 1979). 25 mg de folha moída liofilizada foram colocados em tubos Eppendorf com 1,8 ml de DMSO. Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C durante 30 min, e após deixados resfriar em ambiente escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro $\lambda=470, 646$ e 663 nm. Os teores foram calculados conforme equações propostas por (Lichtenthaler, 1987).

2.6. Análise foliar de nutrientes

Três amostras de folhas secas por tratamento foram enviadas a um laboratório de análise foliar especializado (Pirasolo- Laboratório Agrotécnico Piracicaba Ltda) para análise foliar dos teores de Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio e Enxofre.

2.7. Componentes de rendimento

Um experimento semelhante foi realizado para a determinação da produtividade de grãos. As plantas foram levadas até a maturação para análise dos componentes de rendimento. Realizou-se a pesagem de massa e contagem de número de vagens por planta, massa e número de grãos por planta, massa de mil grãos, número de grãos por vagem, altura da planta e número de nós produtivos.

2.8. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, e em esquema fatorial 2 (fatores: Foliar e Semente) X 4 (tratamentos: EA 0,25%, EA 0,50%, HP 0,20% e controle) X 6 (repetições). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos Shapiro Wilk, e testada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Para as variáveis que não atenderam os pressupostos dos testes os dados foram submetidos a

transformação log. Posteriormente, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Esta análise foi realizada por meio da função “`fac.2.dic()`” do pacote “*ExpDes.pt*” (Ferreira et al., 2021).

Uma análise de agrupamento hierárquico foi utilizada para avaliar a similaridade entre PB e entre variáveis respostas analisadas. Nesta análise, os dados foram padronizados e a matriz de similaridade foi gerada pelo método da distância euclidiana. Posteriormente os agrupamentos foram gerados pelo método de Ward. Esta análise foi gerada por meio da função “`heatmap.2()`” do pacote “*gplots*” (Warnes et al., 2014). Todas as análises foram realizadas por meio do software R v.4.0.0 (<https://www.r-project.org/>).

3. RESULTADOS

3.1. Biomassa da planta, número e massa de nódulos

Encontrou-se efeito do modo de aplicação (MA) e dos PB na massa de matéria seca (MS) de folhas, caule, raiz e nódulos, e número de nódulos da soja (Tabela 1 [Material suplementar 1]). Foi constatado efeito significativo dos PB sobre o MS de folhas e caule, sem interferência do MA utilizado. Para MS de folhas verificou-se que o EA 0,50% foi superior ao HP 0,20% e o controle, em 10,79% e 13,16% respectivamente. EA 0,25% teve resultado intermediário, não se diferenciando de EA 0,50% e HP 0,20%, sendo apenas maior que o controle em 8,17% (Figura 1A). O tratamento com EA 0,50% também apresentou maior MS de caule, sendo superior ao EA 0,25%, HP 0,20% e ao controle, 12,53%, 12,62% e 13,88%, respectivamente, sendo que estes não se diferenciam entre si (Figura 1B). Para MS de raiz, não houve interação entre o MA e os PB, entretanto os PB apresentaram efeito significativo sobre MS raiz, sendo que o HP 0,20% apresentou 22,6% maior MS que o EA 0,50% (Figura 1C). Para MS de nódulos, número de nódulos, e MS de um nódulo não foi verificado diferença estatística entre os tratamentos e controle.

Figura 1. Efeito do tratamento com bioestimulantes em massa seca de folha (A, CV=2,29%), massa seca de caule (B, 9,97%) e massa seca de raiz (C, CV=10,08%) de soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns: não significativo

3.2. Atividades enzimáticas

Houve interação entre o MA e o tratamento com PB na atividade da enzima RN, não ocorrendo o mesmo para as enzimas GS e GOGAT. No entanto não houve diferença entre os tratamentos com PB na atividade da enzima RN tanto na aplicação em semente quanto na aplicação foliar. A atividade das enzimas GS e GOGAT não apresentaram interação entre o MA e os PB, também não havendo resposta significativa para a aplicação dos PB (Tabela 2 [Material suplementar 1]).

3.3. Compostos nitrogenados

A Anova *two-way* mostrou interação entre os MA e a variável PB para o teor de AA na folha (Tabela 3 [Material suplementar 1]). Para estes compostos nitrogenados a aplicação de EA 0,25% e EA 0,50% nas folhas apresentou valores 29% e 27% maiores em relação ao controle, respectivamente. O HP 0,20% não se diferenciou destes nem do controle (Figura 2A). Para o teor de AA na seiva o MA não interferiu nos resultados dos tratamentos com PB, entretanto havendo resposta para a aplicação destes. Todos os PB testados diminuíram o teor de AA na seiva do xilema. O HP 0,20%, EA0,25% e o EA0,50% reduziram 31,18, 41,49 e 43,04% respectivamente, o teor deste composto nas plantas tratadas (Figura 2B).

Figura 2. Efeito do modo de aplicação e bioestimulantes no teor de aminoácidos em folhas (A, CV=20,6%) e seiva do xilema (B, CV=29,75%) de soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns: não significativo

Para o conteúdo de ureídeos na folha e seiva também se encontrou interação entre os modos de aplicação e a variável PB (Tabela 3 [Material suplementar 1]), porém não havendo diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos modos de aplicação para ureídeos na folha (Figura 3A). Já para o teor de ureídeos na seiva, no tratamento de sementes os tratamentos com extrato de alga, EA 0,25% e EA 0,50% foram menores que o controle em 63,88 e 81,66%, respectivamente. No MA foliar os PB não se diferenciaram estatisticamente (Figura 3B).

Figura 3. Efeito do modo de aplicação e bioestimulantes no teor de ureídeos na folha (A, CV=68,97%) e seiva do xilema (B, CV=48,55%) de soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns: não significativo

Não foi encontrado interação entre o MA e os PB para os teores de nitrato na folha e na seiva do xilema. Também não havendo respostas aos tratamentos com PB desconsiderando o MA para o teor de nitrato na seiva. Para o teor de nitrato na folha o HP 0,20% apresentou valores superiores ao controle, EA 0,25% e EA 0,50% em 12,41, 11,11 e 9,80 respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Efeito do tratamento com bioestimulantes no teor de nitrato em folhas de soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV= 8,85%

3.4. Pigmentos fotossintéticos

Nenhum dos pigmentos fotossintéticos apresentou resultados significativos, não havendo interação entre a variável PB e o MA, nem diferença entre os tratamentos (Tabela 4) [Material suplementar 1]. O teor de carotenoides não apresentou interação entre o MA e os PB, havendo efeito separado dos PB. EA 0,25% resultou em teores maiores que EA 0,50% em 51,88% (Figura 5).

Figura 5. Efeito do tratamento com bioestimulantes no teor de carotenoides em soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV=52,96%

3.5. Análise foliar de nutrientes

A Anova *two-way* encontrou interação entre os PB e MA para os nutrientes K, Mg e S, não havendo interação para os nutrientes N, P e Ca (Tabela 5 (Material Suplementar 1)). O HP 0,20%, independente do MA, resultou em teores menores de P (-4,41%) (Figura 6A), o mesmo ocorrido na aplicação em semente para os teores de K (-12,53%) (Figura 6B), em relação as plantas controle. Para os teores de K, a aplicação de EA 0,50% em sementes também foi menor em relação ao controle (-11,19%), para o mesmo EA 0,50% em aplicação foliar, foram encontrados teores maiores de Mg (+13,36%) (Figura 6C). Para os teores de S, apenas EA 0,25% aplicação foliar resultou em teores maiores em relação ao controle (+21%) (Figura 6D).

Figura 6. Efeito do tratamento com bioestimulantes no teor de nutrientes em folhas de soja. Fósforo (A, CV=2,37%), Potássio (B, CV=4,56%), Magnésio (C, CV=5,05%) e Enxofre (D, CV=7,92%). Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns: não significativo

3.6. Componentes de rendimento

Não foi encontrada interação entre MA e o tratamento com PB (Tabela 6 [Material suplementar 1]). Para o número de nós produtivos e número de grãos por vagem não houve resposta significativa em relação aos tratamentos. Para os demais componentes analisados, altura de planta, número e massa de vagens por planta, número e massa de grãos por planta e massa de mil grãos houve efeito significativo com os PB, porém sem influência do MA (Tabela 1). A produção de grãos também apresentou acréscimo em plantas tratadas em relação às não tratadas com os PB (Figura 7). HP 0,20%, EA 0,25% e EA 0,50%

apresentaram produção de grãos maiores em relação ao controle de 26, 27 e 28% respectivamente.

EA 0,50% e HP 0,20% não se diferenciaram do controle apenas nos parâmetros de altura de planta e peso de mil grãos, no entanto estes e EA 0,25% foram maiores que o controle em todos os demais parâmetros, número e massa de vagens por planta e número e massa de grãos por planta, além da produção de grãos.

Tabela 1. Efeito do tratamento com bioestimulantes na altura de planta (AP), número de nós produtivos por planta (NP), vagens por planta (VP), grãos por planta (GP), grãos por vagem (GV), massa seca de vagens (MSV), massa seca de grãos (MSG) e peso de mil grãos (1000G) de plantas de soja.

Tratamentos	AP	NP	VP	GP	GV	MSV	MSG	1000G
	— cm —						— g —	
Controle	68,83 b	64,83 Ns	120,33 b	284,02 b	2,37 ns	46,10 b	28,75 b	100,94 b
HP 0,20%	70,08 ab	70,42	142,58 a	350,42 a	2,46	60,04 a	38,71 a	110,88 ab
EA 0,25%	73,33 a	69,08	141,67 a	343,22 a	2,42	59,71 a	39,54 a	115,18 a
EA 0,50%	72,42 ab	70,50	147,17 a	351,97 a	2,40	61,83 a	39,91 a	113,47 ab
CV (%)	5,64	8,45	10,08	10,9	5,88	13,56	16,84	11,6

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). ns= não significativo.

Figura 7. Efeito do tratamento com bioestimulantes na produção de grãos de soja. Barras indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.7. Análise hierárquica de grupos

A partir da análise do agrupamento hierárquico foram formados dois grandes grupos entre os parâmetros analisados (Figura 8). No primeiro, verificou-se a existência de cinco sub-grupos.

O primeiro pequeno grupo foi formado por clorofila *a*, MS raiz, agrupado principalmente por HP 0,20% e EA 0,25% aplicados na folha. Estes estão agrupados com outro grupo menor formado por carotenoides e atividade de GS, agrupados pelos mesmos tratamentos, além do EA 0,25% tratamento de semente. Outro grupo menor foi formado por nitrato na folha e atividade de GOGAT, pelo efeito das do tratamento com HP 0,20% foliar. O quarto menor grupo ficou composto por AA e ureídeos nas folhas, com maior peso em EA nas duas concentrações com aplicação foliar. O último menor grupo deste grande grupo foi formado por AA e ureídeos na seiva, com maior efeito de HP 0,20% na semente e controle. No segundo maior grupo foram formados 3 grupos menores. No primeiro tiveram maior similaridade MS de folha e caule, com maior força nos dois MA de EA 0,50%. No segundo menor grupo deste grupo tiveram maior similaridade clorofila total e Cb, nos dois MA de EA 0,50% além de HP 0,20% na semente. Por último, ficou separada a enzima RN com maior contribuição nas duas concentrações de EA no tratamento de semente.

Figura 8. Análise de agrupamento hierárquico dos resultados de plantas de soja tratadas e não-tratadas com bioestimulantes. Ca=clorofila a, RDW= massa seca de raiz, Carot=carotenoides, GS=glutamina sintetase, NitF= nitrato na folha, GOGAT= glutamato sintase, Aaf= aminoácidos na folha, UREf= ureídeos na folha, URES= ureídeos na seiva do xilema, Aas= aminoácidos na seiva do xilema, SDW= massa seca de caule, LDW= massa seca de folha, Ctot= clorofila total, Cb= clorofila b, NR= redutase de nitrato, HP_F= HP 0,20% aplicação foliar, AE25_F= EA 0,25% aplicação foliar, C=controle, AE25_S= EA 0,25% tratamento de sementes, AE50_S= EA 0,50% tratamento de sementes, AE50_F= EA 0,50% aplicação foliar, e HP_S= HP 0,20% tratamento de sementes.

A seguir, na tabela 2, podemos verificar o comportamento geral dos resultados analisados. Sendo apresentados os desempenhos dos tratamentos com PB, com influência ou não do MA, em relação as plantas não tratadas, em cada fator analisado.

Tabela 2. Variação percentual dos resultados das análises em relação às plantas controle.

	HP 0,20%	EA 0,25%	EA 0,50%	ns
Bioestimulantes sem interação com modo de aplicação				
MS folha	0	0	+13,16	
MS caule	0	0	+13,88	
AA na seiva	-31,18	-41,49	-43,04	
Nitrato na folha	+12,41	0	0	
Nitrato na seiva				X
GS				X
GOGAT				X
Carotenoides	0	0	0	
Clorofila a				X
Clorofila b				X
Clorofila total				X
Altura de planta	0	+6,13	0	
Nós produtivos				X
Número de vagens	+15,6	+15,05	+18,23	
MS vagens	+23,2	+22,79	+25,44	
Número de grãos	+18,95	+17,24	+19,3	
MS grãos	+25,75	+27,31	+27,98	
MS 1000 grãos	0	+12,35		
Número de grãos por vagem				X
Número de nódulos				X
MS nódulos por planta				X
MS por nódulo				X
Nitrogênio				X
Fósforo	-4,41	0	0	
Cálcio				X
Bioestimulantes no tratamento de sementes				
MS raiz				X
AA na folha				X
Ureídeos na folha				X
Ureídeos na seiva	0	-63,88	-81,66	
RN				X
Potássio	-12,53	0	-11,19	
Magnésio				X
Enxofre				X
Bioestimulantes na aplicação foliar				
MS raiz	0	0	0	
AA na folha	0	+29,04	+26,81	
Ureídeos na folha				X
RN				X
Potássio	0	0	0	
Magnésio	0	0	+13,36	
Enxofre	0	+21	0	

(ns) resultados não diferem estatisticamente das plantas controle. MS: massa seca; AA: aminoácidos; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; RN: redutase de nitrato.

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que PB aplicados em soja influenciaram a biomassa de planta, apresentando maior parte aérea na aplicação da maior dose de AE, e maior sistema radicular com PB á base de HP aplicado às folhas. Os componentes de rendimento da cultura também foram alterados pela aplicação de PB, não havendo interferência do MA. Todos os PB testados aumentaram parâmetros como altura de planta, número e peso de vagens e grãos, porém, não influenciaram parâmetros como número de ramos e altura de inserção do primeiro nó. Os parâmetros relacionados ao metabolismo de N alterados com PB foram teor de AA nas folhas, aumentando com a aplicação de EA foliar, sendo que o teor deste composto nitrogenado na seiva foi reduzido com a aplicação de todos os PB, tal qual o teor de ureídeos na seiva. O teor de nitrato na folha foi aumentado com a aplicação do bioestimulante a base de HP, independente do MA.

Os principais efeitos da aplicação de EA e HP documentados têm relação com aumento de produtividade, qualidade de frutos, desenvolvimento da planta, como biomassa de parte aérea e raízes, e isso devido a presença de AA, hormônios, betaínas, carboidratos, citocininas, macro e micronutrientes (Yakhin et al., 2017; Rodrigues et al., 2020). O aumento significativo na produção de biomassa de folha e caule com a aplicação do EA, em relação às plantas controle, neste trabalho, pode ser explicado pela presença de citocininas no composto, que estimulam a divisão celular das plantas (Mooney and van Staden, 1986). Aumento de biomassa também foi encontrado por Rathore et al. (2009), os autores aplicaram EA *Kappaphycus alvarezii* a 7,5, 10, 12 e 15% em soja e verificaram aumentos de 6,37, 8,76, 6,89 e 6,07%, respectivamente, na biomassa da planta em relação ao controle.

O aumento de biomassa também pode ser devido a um aumento na absorção de nutrientes pela planta quando tratadas com PB (Jannin et al., 2013; Colla et al., 2015). O suprimento de N em plantas leguminosas, como a soja, dá-se pela relação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Zimmer et al., 2016), sendo que a massa de nódulos na planta de soja está diretamente associada com a capacidade de fixação de N (Pazdernik et al., 1996). EA e HP testados não apresentaram efeito sobre a nodulação. No entanto, não foi observada redução na capacidade de nodulação da soja, diferente do encontrado por Klahold et al. (2006), onde o bioestimulante reduziu a massa de número de nódulos em relação as plantas não tratadas. Apesar disso, os autores destacaram que a capacidade de fixação de N não foi reduzida devido ao número considerável de nódulos presente nas plantas. Em nosso caso, também analisamos o teor de nutrientes nas folhas do primeiro ensaio e não observamos diferenças nos teores de N, porém houve aumento nos teores de Mg e S com aplicação de EA.

Rathore et al. (2009) encontraram teores maiores de N, P, K e S em grãos de soja, em ensaio de campo com soja tratada com EA *K. alvarezii*, na palhada apenas P apresentou teores maiores que o controle. Tratando uvas plantadas em vasos com PB contendo substâncias marinhas bioativas, Mancuso et al. (2006) observaram teores maiores de N, P, K e Mg nas folhas após o tratamento. Segundo Halpern et al. (2015), PB elevam a absorção de nutrientes melhorando a estrutura do solo, o que não explica quando a aplicação ocorre em hidroponia ou via folhas; melhorando a solubilidade de micronutrientes, aumentando a relação raiz/parte aérea, e ainda por meio da promoção de relações simbiótica entre fungos micorrízicos e sistema radicular.

Para entender a relação entre o aumento de biomassa e o metabolismo de N, analisamos a atividade da enzima RN. Esta enzima está envolvida nas primeiras etapas de assimilação de N em soja, sendo responsável por reduzir nitrato a nitrito (Taiz et al., 2017). Neste trabalho a atividade da RN não foi alterada com a aplicação dos PB, contudo houve um aumento significativo nos teores de nitrato em folhas com a aplicação de bioestimulante a base de HP, sugerindo um acúmulo do composto. A redução da expressão do gene de RN em função da aplicação de PB á base HP já foi demonstrada em folhas de tomate. Sestili et al. (2018) cultivaram tomate em baixo e alto nível de N e forneceram HP a elas via foliar ou solo. Após 78 h observaram maior acúmulo de NO_3 nas folhas das plantas que estavam crescendo em alto N e que tinha recebido HP via solo, sendo maior do que via foliar e controle. Entretanto, a análise do N total não mostrou diferenças entre os tratamentos com os níveis de N, mas mostrou diferença entre os modos de aplicação, sendo maior na aplicação via solo, independentemente do nível de N fornecido. Curiosamente, tanto tomates crescidos com baixo ou alto fornecimento de N apresentaram menor expressão da RN, sendo justificada como efeito da presença de AA no composto ou a redução de transportadores dos compostos amônio e nitrato.

Mesmo com a não alteração da atividade da enzima, ou sua redução, o aumento da biomassa das plantas pode ser devido aos bioestimulantes servirem como fonte de N para a planta (Ruiz et al., 2000). Porém isto é pouco provável porque a quantidade demandada de N por uma planta ultrapassa muito a quantidade fornecida via PB. Em nabo foi observado que a aplicação de EA aumentou a atividade da enzima RN na parte aérea, porém, não se verificou variação no acúmulo de N (na forma de nitrato), possivelmente efeito de diluição do nutriente, devido a estas plantas apresentarem maior biomassa de parte aérea (Jannin et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que com a aplicação de PB á base de HP não houve aumento da biomassa de folha, caule e raiz, ao passo que o acúmulo de nitrato nas folhas foi

superior. Em milho, com plantas de 22 dias cultivadas sob hidroponia, HP á base de alfafa aumentou as atividades das enzimas RN, GS e GOGAT (Schiavon et al., 2008). Este resultado difere do encontrado neste estudo, onde as atividades dessas enzimas não foram alteradas, fortalecendo a ideia de que a aplicação de PB apresenta padrões de resposta distintos em função da espécie de planta avaliada (De Saeger et al., 2020).

Após ser absorvido na raiz o N pode ser transportado para a parte aérea da planta. Na soja as principais moléculas transportadoras de N são os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, podendo representar mais de 80% do N assimilado (Atkins, 1987). Ureídeos apresentam uma alta proporção N:C = 1:1, sendo sintetizados nos nódulos e enviados à parte aérea via xilema, e considerados indicadores da fixação biológica (McClure et al., 1980). Uma redução de ureídeos na seiva foi observada no tratamento de sementes com EA, o que também ocorreu com o teor de AA na seiva. Não havendo influência do modo MA. Tal resultado ocorreu devido a menor atividade da fixação de N (Alves et al., 2000), o que poderia estar relacionado com teores maiores de AA nas folhas, demonstrando uma redução no seu catabolismo (Foyer et al., 2003). Embora nossas plantas não estivessem sob estresse, esse comportamento foi verificado em plantas de soja sob condição de estresse hídrico, que tiveram sua fixação de N reduzida, e assim apresentaram acúmulo de AA, além de ureídeos, nas folhas (King e Purcell, 2005).

Nas folhas também estão presentes clorofilas e carotenoides, pigmentos responsáveis pela fotossíntese. Os carotenoides exercem papel importante na foto-proteção da planta, além de servirem como pigmentos acessórios (Taiz et al., 2017). Além de agirem como agentes antioxidantes, estes pigmentos fotossintéticos ajudam na defesa a estresse abióticos em plantas (Ramarajan S, 2013). Teores menores de carotenoides foram encontrados em plantas com a aplicação de EA 0,50%, em relação a EA 0,25%. Este resultado foi obtido também por Rosário Rosa et al. (2021), onde a aplicação dos tratamentos com EA reduziram os teores deste pigmento em plantas de soja submetidas a estresse hídrico. Porém, mesmo sob estresse hídrico, as plantas tratadas com EA apresentaram maiores teores de carotenoides em relação as não tratadas nas mesmas condições. Estes resultados sugerem que a aplicação de PB aumenta a capacidade de recuperação após o estresse hídrico para soja. No entanto, vale ressaltar que os resultados observados em plantas sob condição de estresse hídrico foram inferiores a plantas em condições normais. Isso corrobora com o fato de que as plantas tratadas com PB no presente estudo não apresentaram resultados inferiores de carotenoides em relação ao controle, diferindo apenas entre os PB avaliados.

Muitos trabalhos já observaram efeitos significativos da aplicação de PB sobre o aumento da produtividade em diferentes culturas, inclusive na soja (Craigie, 2011; Colla et al., 2014b; Bulgari et al., 2015; Karthikeyan e Shanmugam, 2016; Kocira et al., 2018; Kocira et al., 2019). Em experimento de campo Szparaga et al. (2018) testaram o tratamento de plantas de soja com PB Atonik (sódio p-nitrophenolate, sódio o-nitrophenolate e sódio 5-nitroguaiacolate dissolvido em água) e Titanium (Ascorbato de Titânio e Sulfato de Magnésio), as plantas foram tratadas entre os estádios V3 e V5 de desenvolvimento em diferentes concentrações. Na média de três anos de tratamento, todos os tratamentos apresentaram plantas mais altas em relação ao controle e no geral a maior concentração apresentou maior número de grãos, produtividade e peso de mil grãos para ambos os PB.

Em nosso estudo, os resultados observados sugerem que a aplicação de HP e EA aumentam o número de vagens e grãos. Além disso, o PB a base de EA proporcionou com maior estatura e massa de mil grãos. Nossos resultados coincidem com os encontrados por Rathore et al. (2009) onde a aplicação de EA *E. máxima*, no período vegetativo e no florescimento, aumentou altura de plantas, número de vagens, peso de mil grãos e número de grãos por vagem. Nossos resultados também mostraram que plantas com maior estatura foram observadas sob aplicação da menor concentração do EA, semelhante ao encontrado por Kocira et al. (2019) com a aplicação do PB Tytanit (*E. máxima*), onde com dupla aplicação da menor concentração (0,07%) as plantas de soja apresentaram maiores alturas de planta, além de maiores números de vagens por planta, número de grãos, porém menor peso de mil grãos. Porém, diferentemente, Rathore et al. (2009) encontraram plantas mais altas com as maiores concentrações de EA de *K. alvarezii* testadas (10, 12,5 e 15%).

Um maior número de vagens ocorreu, embora não tenha aumentado o número de nós produtivos por planta no tratamento com PB, isto pode estar relacionado ao menor abortamento de flores, ou ainda a uma maior indução floral, porém carece de pesquisas que comprovem esta hipótese. Além do maior número de vagens, as plantas também apresentaram maior peso de mil grãos, esse fato pode ser referente a maior absorção de nutrientes ou ao maior direcionamento de carbono (C) para estes grãos. Devido ao fato destas plantas também terem apresentado maior biomassa de folha, pode ter apresentado maior capacidade de fornecer C a estes grãos. Estes efeitos devem ser ainda investigados em maiores pesquisas.

Segundo Kocira et al. (2019) maiores atividades enzimáticas do metabolismo de C e N devem estar relacionadas no aumento de produtividade de plantas quando tratadas com PB. Nossos resultados demonstraram maior produtividade da cultura com aplicação de HP e EA, porém isso não pode ser claramente associado a maior atividade do metabolismo de N. Neste

sentido, mais pesquisas ainda são necessárias para esclarecer quais os mecanismos relacionados as respostas de aumento da produtividade em soja, visto que resultados distintos podem ocorrer devido a variação existente nos bioestimulantes como fabricação, componentes, número, época e modo de aplicação, além do genótipo da planta (Paradiković et al., 2011; Szparaga et al., 2018).

5. CONCLUSÃO

Os bioestimulantes a base de *Ascophyllum nodosum* e hidrolisado de proteínas promoveram maior produção de biomassa e produção de grãos das plantas tratadas, aumentando massa de folhas e caule, número de vagens por planta, número de grãos e produção em grãos. Os modos de aplicação não apresentaram efeito sobre a maioria dos parâmetros analisados, podendo ser definida conforme melhor se adequa ao manejo. As duas concentrações do extrato de alga e hidrolisado de proteína alteraram poucos fatores do metabolismo de nitrogênio, demonstrando não afetar este processo, tampouco negativamente, apesar disso podem ser utilizados para aumentar a produção de grãos da cultura da soja. O extrato de alga na concentração 0,25% proporcionou o maior número de aumentos em biomassa e produção de grãos.

REFERÊNCIAS

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes Gonçalves JL, Sparovek G** (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Zeitschrift* **22**: 711–728
- Alves BJR, Resende AS, Urquiaga S, Boddey RM** (2000) Biological nitrogen fixation by two tropical forage legumes assessed from the relative ureide abundance of stem solutes: ¹⁵N calibration of the technique in sand culture. *Nutr Cycl Agroecosystems* **56**: 165–176
- Anisimov MM, Chaikina EL** (2014) Effect of Seaweed Extracts on the Growth of Seedling Roots of Soybean (*Glycine max* (L .) Merr .) Seasonal Changes in the Activity. *Int J Curr Res Acad Rev* **2**: 19–23
- Atkins CA** (1987) Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant Soil* **100**: 157–169
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B** (2015) Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic (Amsterdam)* **196**: 39–48
- Boselli M, Bahouaoui MA, Lachhab N, Sanzani SM, Ferrara G, Ippolito A** (2019) Protein hydrolysates effects on grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Corvina) performance and water stress tolerance. *Sci Hortic (Amsterdam)* **258**: 108784
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Bulgari R, Cocetta G, Trivellini A, Vernieri P, Ferrante A** (2015) Biostimulants and crop responses: a review. *Biol Agric Hortic* **31**: 1–17
- Cafaro La Menza N, Monzon JP, Specht JE, Lindquist JL, Arkebauer TJ, Graef G, Grassini P** (2019) Nitrogen limitation in high-yield soybean: Seed yield, N accumulation, and N-use efficiency. *F Crop Res* **237**: 74–81
- Campobenedetto C, Mannino G, Agliassa C, Acquadro A, Contartese V, Garabello C, Berteà CM** (2020) Transcriptome Analyses and Antioxidant Activity Profiling Reveal the Role of a Lignin-Derived Biostimulant Seed Treatment in Enhancing Heat Stress Tolerance in Soybean. *Plants*
- Castro PR de C e, Campos GR, Carvalho MEA** (2019) Biorreguladores e bioestimulantes agrícolas, Divisão de Biblioteca, Produtor Rural **71**: 74
- Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant Anal* **6**: 71–80
- Colla G, Cardarelli M, Bonini P, Rouphael Y** (2017) Foliar applications of protein hydrolysate, plant and seaweed extracts increase yield but differentially modulate fruit quality of greenhouse tomato. *HortScience* **52**: 1214–1220
- Colla G, Nardi S, Cardarelli M, Ertani A, Lucini L, Canaguier R, Rouphael Y** (2015) Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic (Amsterdam)* **196**: 28–38
- Colla G, Rouphael Y, Canaguier R, Svecova E, Cardarelli M** (2014a) Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis . *Front Plant Sci* **5**: 448
- Colla G, Rouphael Y, Canaguier R, Svecova E, Cardarelli M** (2014b) Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front Plant Sci* **5**: 448
- Craigie JS** (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J Appl Phycol* **23**: 371–393
- Del Buono D** (2021) Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. *Sci Total Environ* **751**: 141763

- Dougall DK** (1974) Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cells cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **58**: 639–646
- EMBRAPA** (2013) Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. Embrapa Soja **16**: 265
- Ertani A, Cavani L, Pizzeghello D, Brandellero E, Altissimo A, Ciavatta C, Nardi S** (2009) Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J Plant Nutr Soil Sci* **172**: 237–244
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA** (2021) ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues). Cran 62
- Foy CD, Fleming AL** (1982) Aluminum tolerances of two wheat genotypes related to nitrate reductase activities. *J Plant Nutr* **5**: 1313–1333
- Foyer CH, Parry M, Noctor G** (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot* **54**: 585–593
- Geddes BA, Oresnik IJ** (2016) The Mechanism of Symbiotic Nitrogen Fixation. Springer, Cham, pp 69–97
- Halpern M, Bar-Tal A, Ofek M, Minz D, Muller T, Yermiyahu U** (2015) The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. *Adv Agron* **130**: 141–174
- Hiscox JD, Israelstam GF** (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* **57**: 1332–1334
- Hoagland DR, Arnon DI** (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *Berkeley Calif Agric Exp Stn* **347**: 29–31
- Jannin L, Arkoun M, Etienne P, Lâiné P, Goux D, Garnica M, Fuentes M, Francisco SS, Baigorri R, Cruz F, et al** (2013) Brassica napus Growth is Promoted by Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *J Plant Growth Regul* **32**: 31–52
- Jardin P du, Xu L, Geelen D** (2020) Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs). *Chem Biol Plant Biostimulants* 1–30
- Karthikeyan K, Shanmugam M** (2016) Development of a protocol for the application of commercial bio-stimulant manufactured from Kappaphycus alvarezii in selected vegetable crops. *J Exp Biol Agric Sci* **4**: 92–102
- King CA, Purcell LC** (2005) Inhibition of N₂ Fixation in Soybean Is Associated with Elevated Ureides and Amino Acids. *Plant Physiol* **137**: 1389 LP – 1396
- Klahold C, Guimarães V, Echer M, Adolfo K, Contiero R, Andréia B** (2006) Resposta da soja (Glycine max (L.) Merrill) à ação de bioestimulante = Soybean (Glycine max (L.) Merrill) response to biostimulant action. *Acta Sci. Agron.* **28**:
- Kocira S, Szparaga A, Kocira A, Czerwińska E, Wójtowicz A, Bronowicka-Mielniczuk U, Koszel M, Findura P** (2018) Modeling Biometric Traits, Yield and Nutritional and Antioxidant Properties of Seeds of Three Soybean Cultivars Through the Application of Biostimulant Containing Seaweed and Amino Acids. *Front Plant Sci* **9**: 388
- Kocira S, Szparaga A, Kuboń M, Czerwińska E, Piskier T** (2019) Morphological and biochemical responses of Glycine max (L.) Merr. To the use of seaweed extract. *Agronomy*.
- Kulkarni MG, Rengasamy KRR, Pendota SC, Gruz J, Plačková L, Novák O, Doležal K, Van Staden J** (2019) Bioactive molecules derived from smoke and seaweed Ecklonia maxima showing phytohormone-like activity in Spinacia oleracea L. *N Biotechnol* **48**: 83–89
- Lichtenthaler HKBT-M in E** (1987) [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Plant Cell Membr. Academic Press*, pp 350–382

- Mancuso S, Azzarello E, Mugnai S, Briand X** (2006) Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Adv Hortic Sci* **20**: 156–161
- Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC** (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour Technol* **97**: 2402–2406
- Martynenko A, Shotton K, Astatkie T, Petrash G, Fowler C, Neily W, Critchley AT** (2016) Thermal imaging of soybean response to drought stress: the effect of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract.
- Mattner SW, Wite D, Riches DA, Porter IJ, Arioli T** (2013) The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia. *Biol Agric Hortic* **29**: 258–270
- Mooney PA, van Staden J** (1986) Algae and Cytokinins. *J Plant Physiol* **123**: 1–21
- Paradiković N, Vinković T, Vinković Vrček I, Žuntar I, Bojić M, Medić-Šarić M** (2011) Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: An example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J Sci Food Agric* **91**: 2146–2152
- Pascale S De, Rouphael Y, Colla G** (2017) Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming. *Eur J Hortic Sci* **82**: 277–285
- Paul K, Sorrentino M, Lucini L, Rouphael Y, Cardarelli M, Bonini P, Reynaud H, Canaguier R, Trtílek M, Panzarová K, et al** (2019) Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato . *Front Plant Sci* **10**: 47
- Pazdernik DL, Graham PH, Vance CP, Orf JH** (1996) Host Genetic Variation in the Early Nodulation and Dinitrogen Fixation of Soybean. *Crop Sci* **36**: 1102–1107
- Ramarajan S HJLSGA** (2013) Effect of Seaweed Extracts Mediated Changes in Leaf Area and Pigment Concentration in Soybean under Salt Stress Condition. *Res Rev A J Life Sci* **3**: 17–21
- Rathore SS, Chaudhary DR, Boricha GN, Ghosh A, Bhatt BP, Zodape ST, Patolia JS** (2009) Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African J Bot* **75**: 351–355
- Rhodes D, Rendon GA, Stewart GR** (1975) The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* **125**: 201–211
- Rodrigues M, Baptistella JLC, Horz DC, Bortolato LM, Mazzafera P** (2020) Organic Plant Biostimulants and Fruit Quality—A Review. *Agronomy* **10**: 988
- Rosário Rosa V do, Farias dos Santos AL, Alves da Silva A, Peduti Vicentini Sab M, Germino GH, Barcellos Cardoso F, de Almeida Silva M** (2021) Increased soybean tolerance to water deficiency through biostimulant based on fulvic acids and *Ascophyllum nodosum* (L.) seaweed extract. *Plant Physiol Biochem* **158**: 228–243
- Ruiz JM, Castilla N, Romero L** (2000) Nitrogen Metabolism in Pepper Plants Applied with Different Bioregulators. *J Agric Food Chem* **48**: 2925–2929
- De Saeger J, Van Praet S, Vereecke D, Park J, Jacques S, Han T, Depuydt S** (2020) Toward the molecular understanding of the action mechanism of *Ascophyllum nodosum* extracts on plants. *J Appl Phycol* **32**: 573–597
- Schiavon M, Ertani A, Nardi S** (2008) Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *J Agric Food Chem* **56**: 11800–11808
- Sestili F, Rouphael Y, Cardarelli M, Pucci A, Bonini P, Canaguier R, Colla G** (2018) Protein Hydrolysate Stimulates Growth in Tomato Coupled With N-Dependent Gene Expression Involved in N Assimilation. *Front Plant Sci* **9**: 1233

- Shekhar SHS, Lyons G, McRoberts C, McCall D, Carmichael E, Andrews F, McCormack R** (2012) Brown seaweed species from Strangford Lough: Compositional analyses of seaweed species and biostimulant formulations by rapid instrumental methods. *J Appl Phycol* **24**: 1141–1157
- Shukla PS, Mantin EG, Adil M, Bajpai S, Critchley AT, Prithiviraj B** (2019) *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Front Plant Sci* **10**: 1–22
- Shukla PS, Shotton K, Norman E, Neily W, Critchley AT, Prithiviraj B** (2018) Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants* **10**: 1–8
- Souza SCR, Mazzafera P, Sodek L** (2016) Flooding of the root system in soybean: biochemical and molecular aspects of N metabolism in the nodule during stress and recovery. *Amino Acids* **48**: 1285–1295
- Szparaga A, Kocira S, Kocira A, Czerwińska E, Świeca M, Lorencowicz E, Kornas R, Koszel M, Oniszczyk T** (2018) Modification of Growth, Yield, and the Nutraceutical and Antioxidative Potential of Soybean Through the Use of Synthetic Biostimulants . *Front Plant Sci* **9**: 1401
- Taiz L, Zeiger E, Moller I max, Murphy A** (2017) *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*, 6th ed. Artmed.
- Tamagno S, Balboa GR, Assefa Y, Kovács P, Casteel SN, Salvagiotti F, García FO, Stewart WM, Ciampitti IA** (2017) Nutrient partitioning and stoichiometry in soybean: A synthesis-analysis. *F Crop Res* **200**: 18–27
- Thibodeau PS, Jaworski EG** (1975) Patterns of nitrogen utilization in the soybean. *Planta* **127**: 133–147
- Thomas R, Schrader L** (1981) Ureide metabolism higher plants. *Phytochemistry* **20**: 361–371
- Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A** (2017) The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem Biol Technol Agric* **4**: 5
- Vogels GD, Van Der Drift C** (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal Biochem* **33**: 143–157
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Liaw WHA, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M** (2014) Gplots: various R programming tools for plotting data. 2016. R Packag. version 2:
- Win TT, Barone GD, Secundo F, Fu P** (2018) Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture. *Ind Biotechnol* **14**: 203–211
- Yakhin OI, Lubyantsev AA, Yakhin IA, Brown PH** (2017) Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective . *Front Plant Sci* **7**: 2049
- Yemm EW, Cocking E, E. Ricketts R** (1955) The Determination of Amino-Acids with Ninhydrin. *Analyst*.
- Zimmer S, Messmer M, Haase T, Piepho H-P, Mindermann A, Schulz H, Habekuß A, Ordon F, Wilbois K-P, Heß J** (2016) Effects of soybean variety and Bradyrhizobium strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. *Eur J Agron* **72**: 38–46

MATERIAL SUPLEMENTAR 1

Tabela 1. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes na biomassa de planta, número de nódulos e massa seca de nódulos.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Massa seca de folhas					
Bioestimulantes (PB)	3	0,1352	0,0451	8,870	0,000
Modo de aplicação (MA)	1	0,0002	0,0002	0,038	0,847
PB x MA	3	0,0132	0,0044	0,866	0,467
Resíduos	40	0,2033	0,0051		
Total	47	0,3519			
CV = 2,29 %					
Massa seca de caule					
Bioestimulantes (PB)	3	163,5200	54,5080	6,333	0,001
Modo de aplicação (MA)	1	0,7900	0,7850	0,091	0,764
PB x MA	3	11,6500	3,8850	0,451	0,718
Resíduos	40	344,3000	8,6080		
Total	47	520,2700			
CV = 9,97 %					
Massa seca de raiz					
Bioestimulantes (PB)	3	0,5270	0,1757	1,310	0,285
Modo de aplicação (MA)	1	0,5124	0,5124	3,821	0,058
PB x MA	3	1,4645	0,4882	3,640	0,021
Resíduos	40	5,3651	0,1341		
Total	47	7,8690			
CV = 10,08 %					
Número de nódulos					
Bioestimulantes (PB)	3	30275	10092,0000	0,41951	0,74064
Modo de aplicação (MA)	1	20910	20910,0000	0,86924	0,36045
PB x MA	3	64152	21384,0000	0,88894	0,46099
Resíduos	24	577332	24056,0000		
Total	31	692669			
CV = 19,25 %					
Massa seca de nódulos.Planta ⁻¹					
Bioestimulantes (PB)	3	0,347	0,11568	0,25745	0,85527
Modo de aplicação (MA)	1	0,8878	0,88778	1,97584	0,17264
PB x MA	3	2,8913	0,9638	2,145	0,121
Resíduos	24	10,7836	0,4493		
Total	31	14,9098			
CV = 17,61 %					
Massa seca.Nódulo ⁻¹					
Bioestimulantes (PB)	3	4,18E-07	1,39E-07	0,17908	0,90953
Modo de aplicação (MA)	1	9,03E-08	9,03E-08	0,11596	0,73643
PB x MA	3	0,0000	0,0000	0,422	0,739
Resíduos	24	0,0000	0,0000		
Total	31	0,0000			
CV = 18,42 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%). Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Tabela 2. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes no teor de compostos nitrogenados.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Nitrato na folha					
Bioestimulantes (PB)	3	0,2740	0,0913	5,866	0,002
Modo de aplicação (MA)	1	0,0188	0,0188	1,208	0,278
PB x MA	3	0,0222	0,0074	0,475	0,702
Resíduos	40	0,6228	0,0156		
Total	47	0,9377			
CV = 8,85 %					
Nitrato na seiva do xilema					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0083	0,0028	0,090	0,964
Modo de aplicação (MA)	1	0,2710	0,2710	8,790	0,018
PB x MA	3	0,1105	0,0368	1,195	0,372
Resíduos	8	0,2467	0,0308		
Total	15	0,6365			
CV = 29,04 %					
Aminoácidos na folha					
Bioestimulantes (PB)	3	6588	2196	1,903	0,1446
Modo de aplicação (MA)	1	15539	15539	13,468	0,0007
PB x MA	3	6929	2310	2,002	0,1292
Resíduos	40	46149	1154		
Total	47	75204			
CV = 20,6 %					
Aminoácidos na seiva do xilema					
Bioestimulantes (PB)	3	21,652	7,217	10,681	0,000
Modo de aplicação (MA)	1	2,609	2,609	3,861	0,056
PB x MA	3	1,773	0,591	0,875	0,462
Resíduos	40	27,029	0,676		
Total	47	53,063			
CV = 29,75 %					
Ureídeos na folha					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0003162	0,00010539	0,5585	0,64552
Modo de aplicação (MA)	1	0,0011408	0,00114075	6,045	0,01837
PB x MA	3	0,002	0,001	3,209	0,033
Resíduos	40	0,008	0,000		
Total	47	0,011			
CV = 68,97 %					
Ureídeos na seiva do xilema					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0032418	0,0010806	8,4348	0,000183
Modo de aplicação (MA)	1	0,0001404	0,00014043	1,0961	0,301408
PB x MA	3	0,001	0,000	3,443	0,026
Resíduos	40	0,005	0,000		
Total	47	0,010			
CV = 48,55 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%).

Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Tabela 3. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes na atividade enzimática de plantas de soja.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Atividade da Redutase de Nitrato					
Bioestimulantes (PB)	3	80804	26935	0,7828	0,51058
Modo de aplicação (MA)	1	674872	674872	19,6137	0,00007
PB x MA	3	488490	162830	4,7323	0,00643
Resíduos	40	1376327	34408		
Total	47	2620494			
CV = 36,14%					
Atividade da Glutamina Sintetase					
Bioestimulantes (PB)	3	0,8173	0,2724	2,0234	0,12603
Modo de aplicação (MA)	1	0,2303	0,2303	1,71038	0,1984
PB x MA	3	0,3787	0,1262	0,93769	0,43146
Resíduos	40	5,3853	0,1346		
Total	47	6,8116			
CV = 41,29 %					
Atividade da Glutamato Sintase					
Bioestimulantes (PB)	3	0,61	0,20	0,87	0,47
Modo de aplicação (MA)	1	1,01	1,01	4,35	0,04
PB x MA	3	0,90	0,30	1,29	0,29
Resíduos	40	9,33	0,23		
Total	47	11,85			
CV = 25 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%).

Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Tabela 4. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes em pigmentos fotossintéticos em soja.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Clorofila a					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0008	0,0003	1,039	0,386
Modo de aplicação (MA)	1	0,0003	0,0003	0,974	0,330
PB x MA	3	0,0006	0,0002	0,824	0,488
Resíduos	40	0,0104	0,0003		
Total	47	0,0120			
CV = 4,21 %					
Clorofila b					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0733	0,0244	2,739	0,056
Modo de aplicação (MA)	1	0,0002	0,0002	0,019	0,891
PB x MA	3	0,0079	0,0026	0,293	0,830
Resíduos	40	0,3570	0,0089		
Total	47	0,4383			
CV = 22,3 %					
Clorofila total					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0562	0,0187	2,227	0,100
Modo de aplicação (MA)	1	0,0001	0,0001	0,006	0,938
PB x MA	3	0,0094	0,0031	0,372	0,774
Resíduos	40	0,3364	0,0084		
Total	47	0,4020			
CV = 11,38 %					
Carotenoides					
Bioestimulantes (PB)	3	0,0111	0,0037	3,238	0,032
Modo de aplicação (MA)	1	0,0001	0,0001	0,117	0,734
PB x MA	3	0,0017	0,0006	0,502	0,683
Resíduos	40	0,0456	0,0011		
Total	47	0,0585			
CV = 52,96 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%). Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Tabela 5. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes no teor de nutrientes foliares de soja.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Nitrogênio					
Biostimulants (B)	3	13,1480	4,3828	0,282	0,837
Modo de aplicação (MA)	1	0,0200	0,0204	0,001	0,972
B x MA	3	15,4150	5,1382	0,331	0,803
Resíduos	16	248,4300	15,5269		
Total	23	277,0130			
CV = 9,69 %					
Fósforo					
Biostimulants (B)	3	0,0218	0,0073	4,043	0,026
Modo de aplicação (MA)	1	0,0193	0,0193	10,729	0,005
B x MA	3	0,0113	0,0038	2,091	0,142
Resíduos	16	0,0287	0,0018		
Total	23	0,0811			
CV = 2,37 %					
Potássio					
Biostimulants (B)	3	8,5210	2,8404	4,861	0,014
Modo de aplicação (MA)	1	18,3750	18,3750	31,444	0,000
B x MA	3	7,4480	2,4828	4,249	0,022
Resíduos	16	9,3500	0,5844		
Total	23	43,6950			
CV = 4,56 %					
Cálcio					
Biostimulants (B)	3	0,4246	0,1415	0,14531	0,93119
Modo de aplicação (MA)	1	0,135	0,1350	0,13861	0,71455
B x MA	3	3,2583	1,0861	1,11515	0,37217
Resíduos	16	15,5833	0,9740		
Total	23	19,4012			
CV = 5,64 %					
Magnésio					
Biostimulants (B)	3	0,15718	0,052393	1,702	0,206714
Modo de aplicação (MA)	1	0,12184	0,121838	3,9579	0,064027
B x MA	3	0,4217	0,1406	4,567	0,017
Resíduos	16	0,4925	0,0308		
Total	23	1,1933			
CV = 5,05 %					
Enxofre					
Biostimulants (B)	3	0,19	0,063333	3,9481	0,027714
Modo de aplicação (MA)	1	0,09375	0,09375	5,8442	0,02793
B x MA	3	0,37458	0,124861	7,7835	0,001992
Resíduos	16	0,25667	0,016042		
Total	23	0,915			
CV = 7,92 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%). Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Tabela 6. Anova *two-way* para modo de aplicação e bioestimulantes nos componentes de produtividade de soja.

Efeito	Gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	P valor
Altura de planta					
Biostimulants (B)	3	154,5000	51,5000	3,195	0,034
Modo de aplicação (MA)	1	16,3300	16,3330	1,013	0,320
B x MA	3	59,1700	19,7220	1,224	0,314
Resíduos	40	644,6700	16,1170		
Total	47	874,6700			
CV = 5,64 %					
Nós produtivos. Planta ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	255,4200	85,1390	2,526	0,071
Modo de aplicação (MA)	1	56,3300	56,3330	1,671	0,204
B x MA	3	39,8300	13,2780	0,394	0,758
Resíduos	40	1348,3300	33,7080		
Total	47	1699,9200			
CV = 8,45 %					
Número de vagens. Planta ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	5166,9000	1722,3000	7,794	0,000
Modo de aplicação (MA)	1	841,7000	841,6900	3,809	0,058
B x MA	3	522,7000	174,2400	0,789	0,507
Resíduos	40	8839,5000	220,9900		
Total	47	15370,8000			
CV = 10,08 %					
Massa seca de vagens. Planta ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	1903,6	634,5400	10,6509	0,00003
Modo de aplicação (MA)	1	23,6	23,5800	0,3957	0,53288
B x MA	3	9,2	3,0600	0,0514	0,98437
Resíduos	40	2383	59,5800		
Total	47	4319,4			
CV = 13,56 %					
Massa seca de grãos. Planta ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	1028,09	342,7	8,953	0,00012
Modo de aplicação (MA)	1	1,19	1,19	0,031	0,86121
B x MA	3	16,0300	5,3400	0,140	0,936
Resíduos	40	1531,0800	38,2800		
Total	47	2576,3900			
CV = 16,84 %					
Peso de mil grãos					
Biostimulants (B)	3	1459,5	486,49	2,9835	0,04252
Modo de aplicação (MA)	1	537	537,01	3,2933	0,07707
B x MA	3	414,2	138,07	0,8467	0,47653
Resíduos	40	6522,4	163,06		
Total	47	8933,1			
CV = 11,6 %					
Número de grãos. Planta ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	37986,0000	12661,9000	9,636	0,000
Modo de aplicação (MA)	1	4118,0000	4117,5000	3,134	0,084
B x MA	3	2913,0000	971,0000	0,739	0,535
Resíduos	40	52559,0000	1314,0000		
Total	47	97575,0000			
CV = 10,9 %					
Número de grãos. Vagem ⁻¹					
Biostimulants (B)	3	0,06197	0,0206576	1,0284	0,39031

Modo de aplicação (MA)	1	0,00317	0,0031687	0,15775	0,69335
B x MA	3	0,00117	0,000391	0,01946	0,99625
Resíduos	40	0,80348	0,0200871		
Total	47	0,8698			
CV = 5,88 %					

Modo de aplicação (sementes ou foliar); Bioestimulantes (Controle, HP 0,20%, EA 0,25%, EA 0,50%). Gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.