FELIPE FUSER POMMORSKY

DESENVOLVIMENTO DE PACOTE BIOTECNOLÓGICO PARA TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

FELIPE FUSER POMMORSKY

DESENVOLVIMENTO DE PACOTE BIOTECNOLÓLGICO PARA TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pommorsky, Felipe Fuser.
Desenvolvimento de pacote biotecnológico para tratamento de sementes de soja / Felipe Fuser Pommorsky. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bioprodutos agrícolas.

Versão do título para o inglês: Development of biotechnological package for treatment of soybean seeds.

1. Soja 2. Fixação de nitrogênio 3. Biotecnologia 4. Produtos agrícolas 5. Bactérias produtoras de nitrogênio 6. Vitamina B12 I. Barbosa, Profa. Dra. Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0174/2015

UNIVESIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato : Felipe Fuser Pommorsky.

Título da Tese: Desenvolvimento de Pacote Biotecnológico para tratamento de sementes de soja.

Orientador(a): Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado **( ) Reprovado**

Examinador (a): Assinatura .....
Nome: .....
Instituição : .....

Examinador (a): Assinatura .....
Nome: .....
Instituição : .....

Examinador (a): Assinatura .....
Nome: .....
Instituição : .....

Examinador (a): Assinatura .....
Nome: .....
Instituição : .....

Presidente: Assinatura .....
Nome: .....
Instituição : .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **276**, referente ao projeto intitulado: "***Agricultura sustentável de soja através do uso de novos fertilizantes biológicos e orgânicos***" sob a responsabilidade de **Felipe Fuser Pommorsky,** foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de novembro de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

"Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior."

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento à todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Heloiza Ramos Barbosa, pela excelente condução da presente tese, por me ensinar sobre ética profissional e ser um exemplo de integridade e sabedoria. Por oferecer os pilares sustentadores na construção desta trajetória acadêmica, pela confiança que sempre depositou em nossos projetos e estudos, sempre atenciosa e prestativa, mostrando sua enorme generosidade e disposição.

Ao professor Crodowaldo Pavan pela amizade, exemplo, dedicação e confiança, que serão eternamente lembrados, e por ter sido um modelo no qual procuro me espelhar.

Agradeço a minha mulher, Juliana, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades com muito amor, compreensão e incentivo. Que me faz uma pessoa melhor todos os dias, obrigado pela paciência, por compartilhar a nossa maravilhosa vida e por ter me dado os meus maiores e mais importantes presentes.

Às minhas filhas, Marcela e Catarina, que embora ainda não tenham conhecimento disto, são a força-motriz que me movem diariamente e me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra amor.

À minha mãe, Ana Beatriz, pelo amor incondicional, por me ter dado a vida, pelos ensinamentos e por ser a maior responsável pela minha formação.

Aos meus irmãos, Eduardo e André, agradeço de forma grata e grandiosa, pelo suporte e constante apoio nos momentos difíceis e importantes, e pelas alegrias e amizade.

À CAPES e o Ministério da Educação pela bolsa nos primeiros anos do doutorado. À FAPESP pelo financiamento, pelos relatórios, recomendações e sugestões dos rigorosos assessores que aprimoraram o meu trabalhos nesses últimos anos. À FINEP e o Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, pelo financiamento, reuniões e experiência profissional.

RESUMO

POMMORSKY, F. F., **Desenvolvimento de pacote biotecnológico para tratamento de sementes de soja.** 2015. 96p Teste (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Novas tecnologias que possibilitem um aumento na produção desse grão, sem causar impactos no ecossistema, são de grande interesse ambiental, social e econômico. Com objetivo de desenvolver um pacote biotecnológico foram realizados quatro grupos de estudos. Em ensaios *in vitro* e *in vivo* foram selecionados, um rizóbio (*Ensifer fredii*) e duas bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Pseudomonas fluorescens* e *Paenibacillus edaphicus*), para serem co-inoculadas em sementes de soja. Por meio de estudos em casa-de-vegetação foram desenvolvidas duas tecnologias aplicadas ao inoculante contendo o rizóbio (fatores Nod e cobamamida), que foram avaliados em conjunto (pacote biotecnológico) em campo de cultivo de soja, que mostrou-se capaz de aumentar a nodulação, o desenvolvimento da planta e rendimento dos grãos dessa leguminosa.

Palavras-chave : Soja. Inoculantes. Fixação Biológica do Nitrogênio. Pacote Biotecnológico. Fatores Nod. Cobamamida.

ABSTRACT

POMMORSKY, F. F., **Development of biotechnological package for treatment of soybean seeds.** 2015. 96p. Ph. D. Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Brazil is the world's second largest producer of soybean. New technologies that increase the production of this grain, without causing environmental impacts, they are of great enviromental, social and economic importance. In order to develop a biotechnological package it was conducted four study groups. Using *in vitro* and *in vivo* assays were selected, one rhizobium (*Ensifer fredii*) and two plant growth promoters bacterias (*Pseudomonas fluorescens* e *Paenibacillus edaphicus*) to b eco-inoculated in soybean seeds. Through studies in greenhouses, two technologies applied to agricultural inoculant have been developed (Nod factors and cobamamide), which were evaluated together (biotecnhological package) in soybean crop field, wich proved capable to increase nodulation, plant growth and yield grain of this legume.

Keywords : Soybean. Inoculants. Biological Nitrogen Fixation. Biotecnhological Package. Nos factors. Cobamamide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema geral do mecanismo catalítico da nitrogenase. 21

Figura 2- Esquema geral da troca de sinais entre *B. japonicum* e soja..... 22

Figura 3- Esquema geral da formação do nódulo. 24

Figura 4 – Metabolismo dos Bacteróides 25

Figura 5 - Estrutura geral dos fatores Nod produzidos por rizóbios..... 30

Figura 6 - Estrutura molecular da Cobamamida 32

Figura 7 - Estrutura da Vitamina B12 32

Figura 8 – Ciclo biológico do nitrogênio 34

Figura 9 - Esquema do ensaio de crescimento em culturas mistas. 38

Figura 10 – Curvas de crescimento de ***B. japonicum*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*..... 50

Figura 11 – Curvas de crescimento de ***B. elkanii*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*..... 50

Figura 12 – Curvas de crescimento de ***E. fredii*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*..... 50

Figura 13 – Curvas de crescimento de ***P. fluorescens*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii*..... 51

Figura 14 – Curvas de crescimento de ***B. subtilis*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii*..... 51

Figura 15 – Curvas de crescimento de ***P. edaphicus*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii*..... 51

Figura 16 – Curvas de crescimento de ***P. fluorescens*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. subtilis e P. edaphicus*..... 52

Figura 17 – Curvas de crescimento de ***B. subtilis*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. fluorescens e P. edaphicus*..... 52

Figura 18 - Curvas de crescimento de ***P. edaphicus*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. subtilis e P. fluorescens*..... 52

Figura 19 - Produtividade de grãos (kg/ha)..... 55

Figura 20 - Concentração de fatores nod (µg/ml) produzidos por *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 e *E. fredii* SMH12 induzidos por diferentes substâncias. 56

Figura 21 - Valores médios da velocidade de germinação. 58

Figura 22 – Rendimento dos grãos de soja (kg/ha). 60

Figura 23 - Massa seca da parte aérea (g/planta) nos 18 tratamentos. 62

Figura 24 - Visão geral do experimento em casa-de-vegetação para avaliação da nodulação com e sem a adição de cobamamida e vitamina B12. 63

Figuras 25 e 26 – Visão geral do experimento em campo de cultivo de soja. 64

Figura 27 - Produtividade de grãos (kg/ha). 66

Figura 35 – Mecanismo de *quorum sensing*..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes bacterianas, suas respectivas coleções bacterianas e meios de cultura utilizados..... 35

Tabela 2. Composição do meio de cultura manitol levedura modificado I..... 36

Tabela 3. Composição do meio de cultura manitol levedura modificado II. 36

Tabela 4. Composição da solução de micronutrientes. 36

Tabela 5. Composição do meio de cultura Aleksandrov. 36

Tabela 6. Composição do meio de cultura Batata Dextrose. 36

Tabela 7. Composição do meio de cultura king B. 36

Tabela 8. Culturas puras e co-culturas de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *E. fredii*..... 37

Tabela 9. Culturas puras e co-culturas de *P. edaphicus* , *B. subtilis* e *P. fluorescens*..... 37

Tabela 10. Culturas puras e co-culturas entre *P. fluorescens* , *B. subtilis* e *P. fluorescens*... 37

Tabela 11. Condições de cultivo das linhagens utilizadas 38

Tabela 12. Tratamentos para avaliação de culturas mistas aplicadas em soja. 39

Tabela 13. Descrição dos diferentes tratamentos para avaliar a produção de fatores Nod por *Ensifer fredii* e *Bradyrhizobium japonicum*. 40

Tabela 14. Concentração das soluções nos diferentes tempos de corrida..... 41

Tabela 15. Tratamentos para avaliar o efeito dos fatores Nod no desenvolvimento das plântulas de soja. 42

Tabela 16 . Tratamentos empregados para avaliar o efeito dos fatores no desenvolvimento da soja. 43

Tabela 17 . Substâncias adicionadas ao meio de cultura para síntese de vitamina B12..... 45

Tabela 18 . Tratamentos empregados para avaliar o efeito da vitamina B12 e cobamamida na nodulação da soja. 46

Tabela 19. Tratamentos para avaliação da aplicação de fatores Nod, cobamamida e diferentes co-inoculações no rendimento de soja. 47

Tabela 20. Parâmetros avaliados no estudo do efeito do novo inoculante e tecnologias no desenvolvimento da soja. 48

Tabela 21. Avaliação da nodulação : (NN) número de nódulos por planta, (MSN) massa seca dos nódulo (mg/planta), (MSPA) massa seca da parte aérea (g/planta), (AP) altura das plantas (cm) e (CR) comprimento da raíz (cm), no florescimento..... 54

Tabela 22. Emergência das sementes aos 4 e 7 dias. 57

Tabela 23. Comprimento da raiz (cm) e parte aérea (cm) das plântulas nos 8 tratamentos. 59

Tabela 24. (NG/V) Número de grãos / número de grãos por vagem (unidade), (MG) massa dos grãos (g) e (IC) índice de colheita (%)..... 60

Tabela 25. Avaliação do número de nódulos (NN) e peso dos nódulos (PN) após 45 dias da semeadura. 63

Tabela 26. Altura da plantas (m)(ALT), nos 16 diferentes tratamentos, Altura media da inserção da primeira vagem (cm)(APV), comprimento médio da vagem (CMV), nos 16 diferentes tratamentos, Número médio de vagens por planta (NMVP), número médio de grãos por vagem (NMGV) e produtividade media de vagens (kg/ha) nos 16 diferentes tratamentos 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ºC – Graus centígrados

ACC – 1- aminociclopropano-1-caboxilato

ADP – Adenosina difosfato

AHL – N-acil homoserina lactona

ANPII – Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes

ARA – Acetylene Reduction Assay

ATP – Adenosina trifosfato

ATCC – American Type Culture Colection

atm – Atmosfera

B. elkanii – *Bradyrhizobium elkanii*

B. japonicum – *Bradyrhizobium japonicum*

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

BOD – Biochemical oxygen demand (câmara incubadora)

CDF – Cell density factor

CMC – Carboximetilcelulose

Co - Cobalto

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.O. – Densidade Ótica

e^- - Elétron

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

Fe - ferro

FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

g – Grama

h – Hora

H_2 – Hidrogênio molecular ou gás hidrogênio

ha – Hectare

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSL – Homoserina Lactona

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

INTA – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária

Kg – Quilograma

L – Litro

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligrama

min – Minuto

Mo – Molibdênio

mL – Militro

mm – Mililitro

μL – Microlitro

μM- Micromolar

nº - Número

NaCl – Cloreto de sódio

NH_3 – Amônia

NFb – Novo Fábio Perosa

O_2 - Oxigênio

pH – Potencial hidrogênionico

P. fluorescens – *Pseudomonas fluorescens*

P. edaphicus – *Paenibacillus edaphicus*

PGPR – Bactérias promotoras de crescimento vegetal

PVP – Polivinilpirrolidona

RELARE – Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

SEMIA – Seção de Microbiologia Aplicada

SENASA – Servicio Nacional de anidad Agraria

UFC – Unidade Formadoras de Colônia

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo Geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
3 REVISÃO DE LITERATURA 20
3.1 A Cultura de soja no Brasil 20
3.2 Fixação biológica de nitrogênio em soja 20
3.3 Formação do nódulo em soja 22
3.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal 26
3.5 Inoculantes comerciais para soja 27
3.6 Desenvolvimento de inoculantes agrícolas mistos 28
3.7 Fatores Nod 29
3.8 Vitamina B12/Cobamamida 31
3.9 Impactos ambientais em agrossistemas 33
4 MATERIAIS E MÉTODOS 35
4.1 Inoculantes agrícolas mistos 35
4.1.1 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vitro) 35
4.1.2 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vivo) 39
4.2 Fatores Nod 40
4.2.1 Produção e quantificação de fatores Nod 40
4.2.2 Avaliação de plântulas de soja com fatores Nod 41
4.2.3 Avaliação do desenvolvimento de soja com fatores Nod 43
4.3 Vitamina B12/ Cobamamida 44
4.3.1 Produção e quantificação de vitamina B12 44
4.3.2 Avaliação da aplicação de cobamamida e vitamina B12 na nodulação da soja 45
4.4 Pacote biotecnológico 47
4.4.1 Avaliação do pacote biotecnológico no rendimento da soja em campo 47
5 RESULTADOS 49

5.1 Inoculantes agrícolas mistos 49
5.1.1 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vitro) 49
5.1.2 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vivo) 54
5.2.Fatores Nod 56
5.2.1 Produção e quantificação de fatores Nod 56
5.2.2 Avaliação do desenvolvimento de plântulas de soja à aplicação de fatores Nod em câmara de germinação 57
5.2.3 Avaliação do desenvolvimento de soja com fatores Nod 59
5.3 Vitamina B12/ Cobamamida 61
5.3.1 Produção e quantificação de vitamina B12 61
5.3.2 Avaliação da aplicação de cobamamida e vitamina B12 na nodulação da soja 61
5.4 Pacote biotecnológico 63
5.4.1 Avaliação do pacote biotecnológico no rendimento da soja em campo 63
6 DISCUSSÃO 67
6.1 Inoculantes agrícolas mistos 67
6.2 Fatores Nod 72
6.3 Vitamina B12/cobamamida 73
6.4 Pacote biotecnológico 75
7 CONCLUSÃO 80
REFERÊNCIAS 81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo (TORRES, 2015), com uma produção de 86,12 milhões de toneladas de grãos (safra 2013/14), que ocupam 30,2 milhões de hectares (CONAB, 2014). O cultivo dessa leguminosa é de grande importância econômica (GOMIERO et al., 2011), sendo considerada a principal "commodity" do agronegócio nacional e grande responsável pelo superávit da balança comercial; o total das exportações do complexo soja ultrapassou US$ 30 bilhões, o que representa 31% das vendas externas do Brasil (CONAB, 2014).

O crescente aumento na produção de soja, para atender à demanda mundial, tem sido acompanhado pelo aumento do uso de agroquímicos na lavoura, que resultam em sérios impactos ambientais (DALLA CORTE et al., 2014). O Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo (MOURA et al., 2014). O agrotóxico visa alterar a composição de um agrossistema, a fim de preservá-lo da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, porém acaba afetando todo o ecossistema (MATOS, 2014). No Brasil, cerca de 500 mil pessoas são contaminadas todos os anos e o impacto causado pelo o uso e fabricação dos agrotóxicos é, muitas vezes, irreversível (FERREIRA et al., 2014).

O preparo do solo para a agricultura convencional resulta em drástica diminuição da microbiota, exterminando os microrganismos decompositores, recicladores, agentes de controle biológico, fixadores de nitrogênio e solubilizadores de rochas (SINGH et al., 2011). O desequilíbrio causado pelo atual sistema de manejo agrícola causa a destruição desses agentes responsáveis pela manutenção da natureza, impossibilitando a produção sustentável dos alimentos, biocombustíveis, matérias primas, entre outros (CHAPARRO, 2012). Atualmente um dos maiores desafios é assegurar o aumento da produção agrícola conservando a biodiversidade, os ecossistemas e mantendo uma base saudável para aqueles que dependem da agricultura para sua sobrevivência, além permitir a produção para as futuras gerações (BLOWERS, 2013; NORBERG; CUMMING, 2013).

A principal maneira de reverter esse quadro será a busca de um novo modelo, capaz de garantir produção estável e viável do ponto de vista econômico, social e ecológico (ALSTON; PARDEY, 2014). O uso de inoculantes contendo microrganismos promotores de crescimento vegetal (*PGPs* – do inglês "plant growth promoters"), pode ser utilizado para defesa e aporte nutricional às plantas, podendo ser uma alternativa

para redução dos custos de produção e do impacto causado pelos adubos químicos e defensivos agrícolas (PANNEERSELVAM et al., 2015). Compreender os mecanismos envolvidos na interação bactérias-planta, selecionar microrganismos que promovam crescimento vegetal e desenvolver técnicas que permitam o aprimoramento dessa relação são aspectos que, devidamente implantados, podem levar ao desenvolvimento sustentável da agricultura nacional (BIEGELMEYER et al., 2015).

O aumento dos rendimentos na sojicultura está intrinsecamente ligado ao nitrogênio fornecido à planta (HUNGRIA et al. 2001; PEOPLES; CRASWELL, 1992), que pode ser obtido pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), que ocorre graças à relação simbiótica desta leguminosa com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Ensifer* (YOUSEIF et al., 2014). Outros mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal são: a produção de ácido cianídrico, que aumenta o desenvolvimento dos pelos radiculares; a produção de hormônios vegetais, como auxinas, etileno, giberelinas e citocininas; liberação de enzimas, como a ACC deaminase que promove desenvolvimento precoce de raízes e proteção contra estresses ambientais, solubilização de fosfato e potássio; produção de vitaminas, aminoácidos, poliaminas e outras substâncias (CASTILLO, 2015; PRASAD et al., 2015; SIVASAKTHI et al., 2014).

Por outro lado, diversos microrganismos possuem mecanismos de biocontrole que protegem as plantas contra patógenos e doenças (PRATT; CENTER, 2012). Os agentes de biocontrole podem atuar por meio de vários mecanismos, como: produção de sideróforos, antibióticos e bacteriocinas, competição por substrato, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (BERG, 2015; MERCADO-BLANCO, 2015; WHITTLE et al., 2015).

Aos inoculantes agrícolas podem ser aplicadas tecnologias que potencializem os benefícios desse insumo no campo, como por exemplo a adição de hidrogenases, lumicroma, fatores Nod, riboflavinas, vitamina B12 e outras substâncias (BASHAN et al., 2014). Os fatores Nod são importantes moléculas sinalizadoras produzidas pelas bactérias durante o processo de nodulação, enquanto a vitamina B12 e sua coenzima (cobamamida), são moléculas essenciais para a formação de nódulos eficientes na FBN, desta forma, essas substâncias podem ser ferramentas que favorecem o estabelecimento da simbiose entre os rizóbios e a soja.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo geral do presente estudo foi desenvolver um pacote biotecnológico, formado pelo conjunto de inoculantes e novas tecnologias, para aplicação em sementes de soja, que resultem no aumento da nodulação, melhor crescimento da planta e maior rendimento dos grãos.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar combinações de bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e/ou *Ensifer*, com outros *PGPs* por meio de testes tanto *in vitro* com *in vivo* (plantas de soja).
- Desenvolver técnica para produção de fatores Nod e analisar o efeito de sua aplicação no desenvolvimento da soja .
- Avaliar a adição e produção de vitamina B12 e cobamamida na nodulação da soja.
- Estudar o efeito da aplicação conjunta dos inoculantes (contendo as bactérias selecionadas) e as novas tecnologias desenvolvidas, no rendimento dos grãos de soja.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Cultura de soja no Brasil

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma planta herbácea da família das fabaceas, originária do Sudeste Asiático (ZERPA et al. 2013). No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, foi a que mais cresceu nos últimos anos (MB AGRO, 2013), aumentado 763% a produção, em quatro décadas e tornando-se o principal grão cultivado no mundo (LOPES, 2013). Tais taxas deverão manter-se, segundo estimativas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (ODECD). O incremento deve-se à expectativa de crescimento da população e pelos crescentes volumes para suprir as necessidades de farelos protéicos (GUERRA, 2006). Os óleos vegetais igualmente pressionam seu crescimento, por sua utilização como biocombustível (biodiesel e H-Bio), pelo qual a soja responde por quase 90% da produção nacional (MB AGRO, 2013). Uma vez que o Brasil é o país que possui o maior potencial de expansão da área cultivada, poderá, desde que tecnicamente adequado, constituir-se no maior produtor e exportador mundial de soja e seus derivados (ABIOVE, 2013).

No Brasil, a expansão de seu cultivo foi impulsionada por diversos fatores como: incentivos fiscais (ZAMBERLAN, 2014), demanda pelo mercado internacional (VAN VLIET, 2012), a substituição do uso de gorduras animais por óleos vegetais (DAN, 2012), melhorias de infraestrutura nacional, topografia favorável à mecanização, e o desenvolvimento de um pacote tecnológico bem sucedido para a produção desse grão (LAMPTEY, 2014) .

3.2 Fixação biológica de nitrogênio em soja

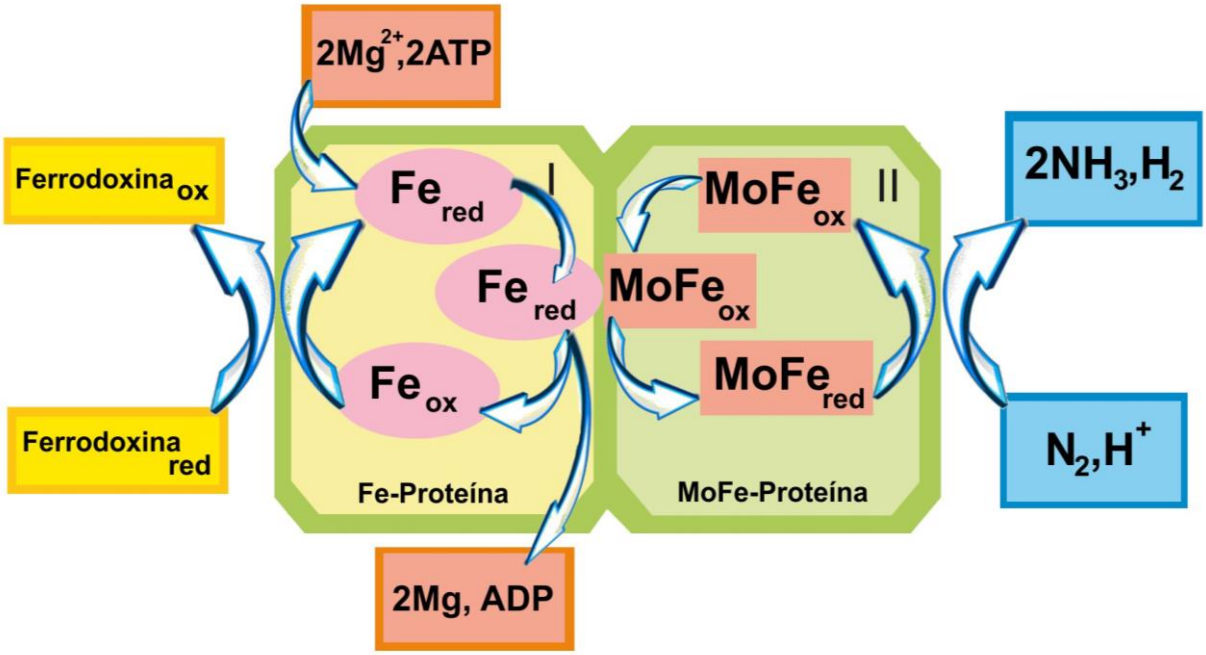
A cultura de soja requer grande demanda de nitrogênio, que pode ser obtido pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (CHANG; HUNGRIA, 2015), realizada por microrganismos diazotróficos, que reduzem o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3).

Na soja a FBN ocorre graças à relação simbiótica com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Ensifer* (JANCZAREK, 2015) que infectam as raízes formando nódulos, estruturas onde o nitrogênio é fixado (CAMPO et al., 2009). O processo de FBN é catalisado pela nitrogenase (OHKAMA-OHTSU et al., 2015), um complexo enzimático

formado por duas proteínas, a dinitrogenase (componente I/Fe-proteína) e a dinitrogenase redutase (componente II/ Mo-Fe-proteína). A redução do N_2 ocorre pela transferência de elétrons da ferredoxina/flavodoxina à dinitrogenase, que reduzida, doa elétrons à dinitrogenase redutase (à qual está ligado o substrato), que recebe os elétrons formando a amônia (figura 1). Alguns rizóbios contém uma enzima, a hidrogenase, capaz de romper as moléculas de H_2 formado pela redução de H^+ a H_2 gasoso, e aumentar a disponibilidade de elétrons para redução de N_2, favorecendo a FBN (BJORNSSON, 2015).

A nitrogenase é irreversivelmente inibida pelo oxigênio atmosférico (O_2); desta forma, os microrganismos diazotróficos possuem mecanismos de proteção à favor dessa enzima. No caso dos rizóbios em simbiose, a proteção é realizada pela leghemoglobina, proteína responsável pelo transporte e manutenção do nível de oxigênio a taxas que permitam contemporizar o processo respiratório da bactéria e o funcionamento da nitrogenase (LARRAINZAR, 2015).

Figura 1- Esquema geral do mecanismo catalítico da nitrogenase.



FONTE: Baseado no modelo de Holland (2011)

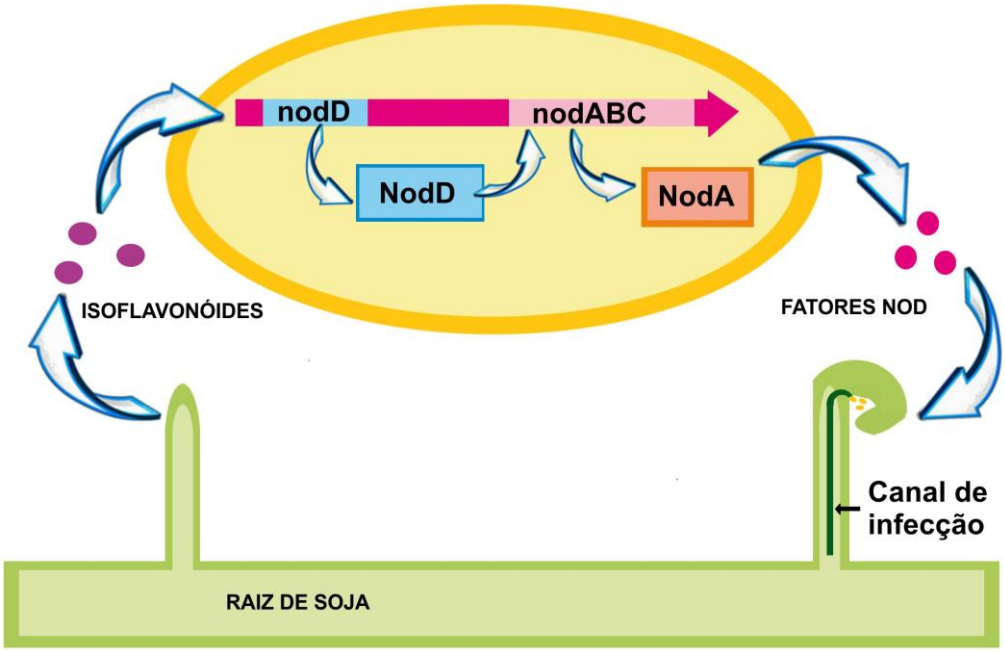
Como a soja não é nativa do Brasil (ZERPA et al. 2013), os solos brasileiros não possuem bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de formar nódulos efetivos com essa

leguminosa, sendo necessária a inoculação desses microrganismos ao solo (LUPWAYI et al. 2005). Vargas e Suhet (1980) afirmam que o sucesso da cultura de soja reside na eficiência do processo de FBN, pois para alcançar a produtividade brasileira, seria necessário aplicar de 300 a 400 kg/ha de ureia. Como a soja possui baixa capacidade de absorção/utilização de nitrogênio dos adubos, essa prática inviabilizaria a cultura no país (CHANG; HUNGRIA, 2015). Calcula-se que a inoculação resulta em uma economia estimada em cerca de R$ 11 bilhões anuais para o Brasil e uma solução ao impacto ambiental causado pelos adubos nitrogenados (EMBRAPA, 2011).

3.3 Formação do nódulo em soja

O início do processo de nodulação depende de um reconhecimento específico entre os rizóbios e a soja (DING; OLDROYD, 2009). O primeiro passo consiste na liberação de fotoassimilados pela soja, sendo que 19% são lançados no solo. Uma análise metabolômica verificou a presença de 166 metabólitos liberados na rizosfera da soja (compostos fenólicos, vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, ácidos carboxílicos e carboidratos).

Figura 2- Esquema geral da troca de sinais entre *B. japonicum* e soja.



FONTE: Baseado no modelo de Stacey et al. (2006).

Dentre os compostos fenólicos, os mais importantes no estabelecimento da simbiose são isoflavonóides (genisteína, daidzeína e isoliquiritigenina) (BOÞGELMEZ-TINA, 2003), considerados os primeiros mensageiros moleculares (MCINNIS; BLACKWELL, 2011). Os isoflavonóides (figura 2) desencadeiam nos rizóbios a expressão dos genes necessários à nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) (STRENG et al. 2011).

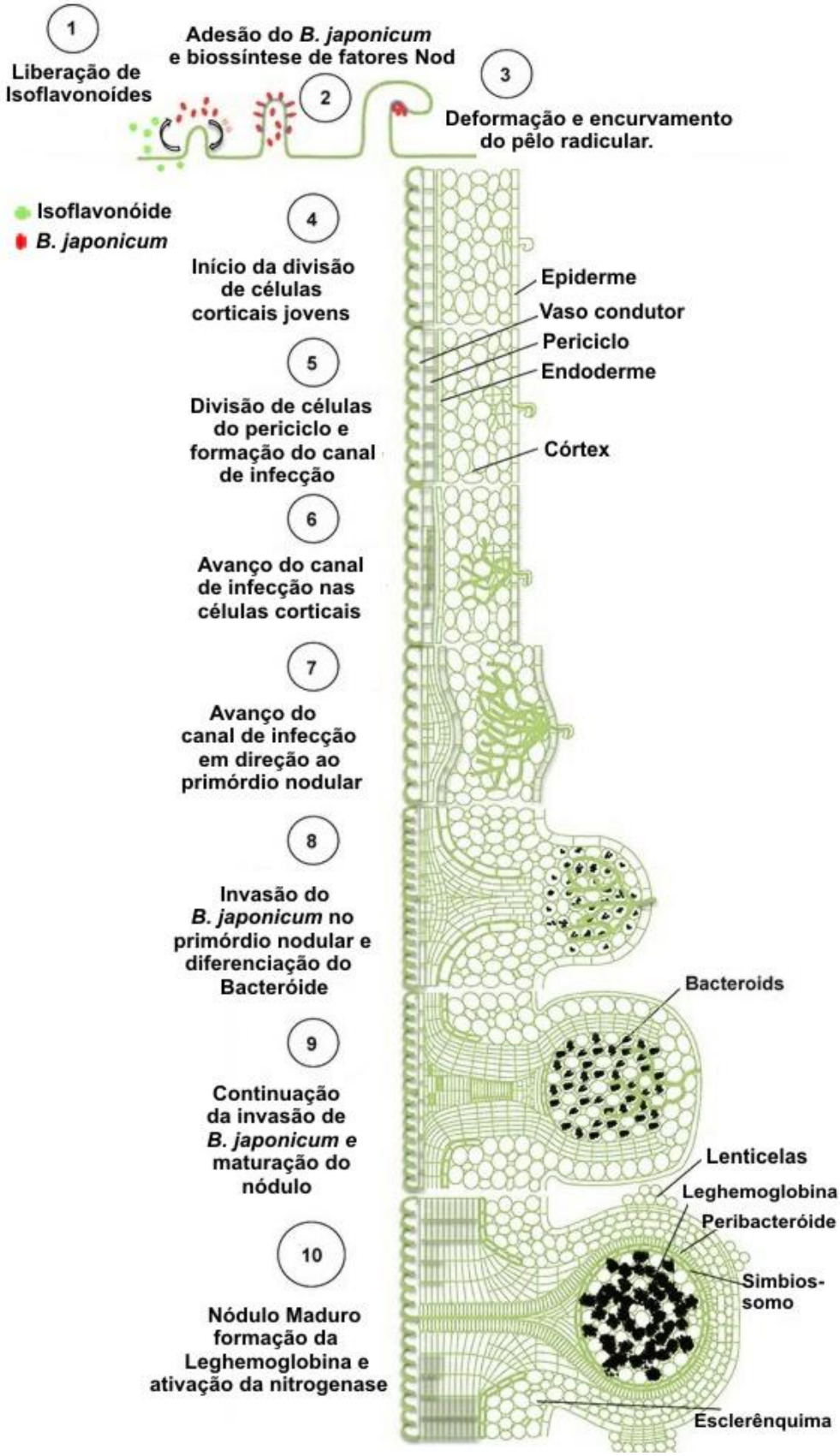
A proteína NodD é a principal mediadora da expressão gênica nos rizóbios, atuando tanto como sensor do sinal emitido pela soja, como ativador transcripcional dos genes do operon *nod* (INDRASUMUNAR et al. 2011). A proteína NodD controla o operon *nod*ABCIJ*nol*O*noe*I, *nod*SU, *noe*E e *no*lI na síntese dos fatores Nod (lipoquitooligossacarídeos) (MCINNIS; BLACKWELL, 2011). A percepção dos fatores Nod ativa a expressão dos genes nodulinos da planta, desencadeando uma série de mudanças, que provocam o encurvamento da extremidade apical do pelo da raiz, com despolarização da membrana celular, reorientação do citoesqueleto, aumento de cálcio intracelular, divisão das células corticais jovens e formação do canal de infecção (STACEY et al, 2006).

A bactéria aderida ao pêlo radicular produz celulases que degradam parte da parede celular da planta, que sofre invaginação, alcançando o canal de infecção. O canal é formado por uma nova parede celular sintetizada pelo hospedeiro, embebida em uma matriz produzida pela bactéria e glicoproteínas vegetais. Quando as ramificações do canal de infecção atingem as células corticais, ocorre a liberação dos rizóbios em seu interior e estes param de se dividir. As bactérias sofrem transformações fisiológicas e morfológicas, passando a ser denominadas bacteróides (MINAMI et al. 1996).

Cada bacteróide é envolvido pela membrana peribacteróide, constituindo o simbiossomo, que está embebido por leghemoglobina. A leghemoglobina é composta por um grupo heme ligado a um grupo protéico, sendo encontrada no citossol intimamente associada ao simbiossomo. A leghemoglobina é responsável pelo transporte e manutenção do nível de oxigênio a taxas que permitam contemporizar o processo respiratório do bacteróide e o funcionamento da nitrogenase (EHRHARDT; WAIS, 1996).

As baixas concentrações de nitrogênio combinado induzem a expressão dos genes *nif*, que codificam as enzimas envolvidas na fixação biológica do nitrogênio, principalmente o complexo nitrogenase, além de proteínas reguladoras (GRAHAM, 2013).

Figura 3 - Esquema geral da formação do nódulo.



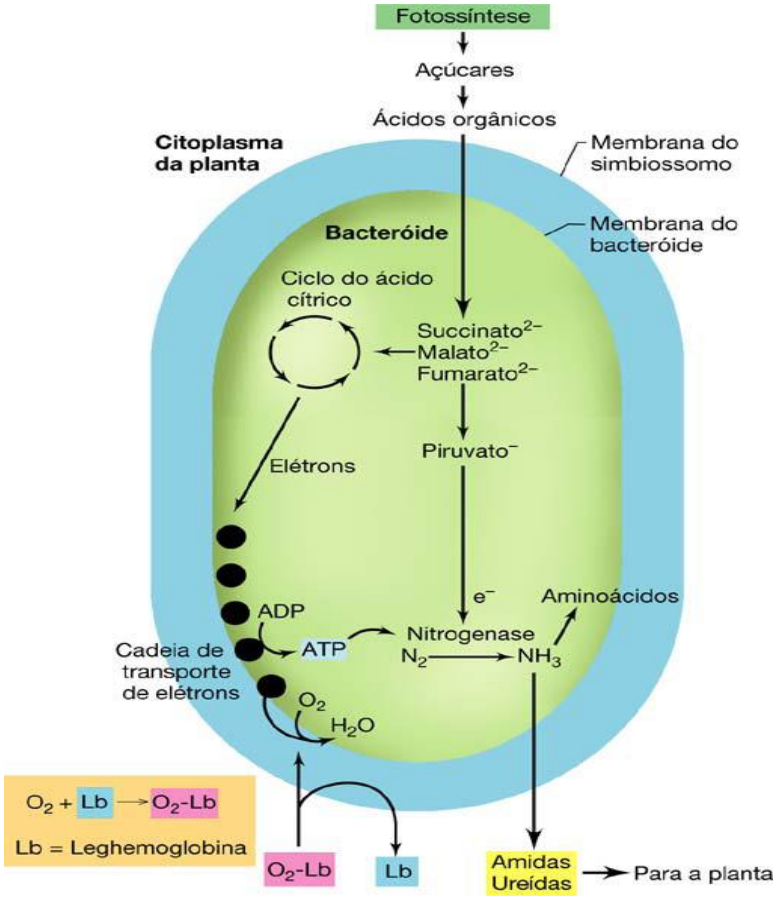
FONTE: PERRET et al. (2000)

A energia para a FBN é suprida por fotossintatos fornecidos pela soja, principalmente malato e succinato (figura 4), que proporcionam uma fonte de carbono e energia para a atividade do bacteróide e da nitrogenase na conversão do nitrogênio em amônia (LIBAULT, 2014).

A excreção de NH_4^+ é facilitada pela alta atividade da glutamina sintetase (GS), responsável pela assimilação do NH_4^+ e a glutamato sintase (GOGAT) da célula vegetal, pela utilização da glutamina para síntese de aminoácidos proteicos (SUN et al., 2013), transferidos para outros compostos (ureídeos, alantoína e ácido alantóico) por meio de reações de transaminação (CHEN et al., 2011).

Ureídeos, asparagina e glutamina são importantes na biossíntese de proteínas nas sementes. Os nitrogênios da alantoína são incorporados em proteína e os ureídeos são degradados no integumento e NH4+ resultante é usado na síntese proteica (FREIXAS et al., 2011). O fluxo de translocação pelos vasos do xilema é reconhecido como o principal meio de transporte do nitrogênio da raiz para a parte aérea (GIL-QUINTANA et al., 2013).

Figura 4 – Metabolismo dos Bacteróides.



FONTE: Libault (2014).

3.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Os microrganismos, principalmente bactérias, possuem mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal, como a FBN, a solubilização de fosfato e a produção de enzimas (ZERPA et al. 2013). Outro mecanismo envolvido na promoção do crescimento vegetal por bactérias é a estímulo da produção de hormônios pelos vegetais (auxinas, giberelinas, citocininas e etileno) que pode resultar em maior crescimento de raízes e parte aérea (BARBIERI; DELAZERI, 2014).

Os agentes de biocontrole reduzem a atividades provocadas pelo patógeno (CHEN et al., 2015). O objetivo do controle biológico é a supressão dos prejuízos econômicos causados pela doença ou praga (LIN et al., 2014). Organismos ideais para a utilização como biocontrole devem possuir boa capacidade de colonização, de fácil cultivo e não serem patogênicos aos homens, animais e plantas (BEZERRA et al., 2013; LUDWIG et al., 2013).

Os gêneros que se destacam como agentes de biocontrole são: *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces* (FONSECA et al., 2014; MACIEL et al., 2014). Esses agentes de biocontrole podem atuar por diferentes mecanismos, como por exemplo a produção de ácido cianídrico (HCN), que resulta na supressão de fungos patogênicos (GOSWAMI, 2014). Bactérias como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* e *Bacillus subtilis* podem produzir antibióticos e bacteriocinas que inibem o crescimento de patógenos diversos , como *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Ralstonia* (PRIETO et al., 2011). Outro mecanismo envolve a competição por substrato, como a realizada por sideróforos (pioverdina) produzidos pela *P. fluorescens*, que apresentam alta afinidade com Fe^{+3}, diminuindo a disponibilidade deste elemento aos patógenos (GIARRATANA et al, 2012). Por fim, certos microrganismos podem ativar mecanismos de defesa do hospedeiro, resultando na indução de resistência sistêmica, pelo aumento da produção de proteínas de defesa, como peroxidase, acúmulo de fitoalexinas e lignificação (CARVAJAL et al., 2015).

Segundo Jjemba e Alexander (1999), a habilidade de sobrevivência das bactérias inoculadas no solo (endofíticas e exofíticas), em colonizar a rizosfera de soja é um fator importante no desenvolvimento de inoculantes contendo *PGP*s, pois as bactérias aplicadas à sojicultora devem ser competitivas em relação à microbiota nativa.

3.5 Inoculantes comerciais para soja

O inoculante agrícola consiste em uma cultura bacteriana de interesse agronômico misturada a um veículo. Podem ser utilizados diversos tipos de veículos, como: polímeros (THAKUR et al., 2015), bagaço de cana, serragem, turfa de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, lignita, diatomita, composto urbano, pó de coco, vermiculita e farinha de ostra (AERON et al., 2011).

No Brasil foram comercializados cerca de 19 milhões de doses de inoculantes em 2011 (ANPII, 2013), sendo 99% para a cultura de soja. O Brasil é o maior produtor mundial de inoculantes para leguminosas e o produto representa em torno de 0,1% do custo de produção (CHANG; HUNGRIA, 2015).

A fiscalização do comércio e qualidade dos inoculantes é realizada pelo CFIC (Coordenação de fertilizantes, inoculantes e corretivos), órgão do MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Baseado no protocolo elaborado pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), as estirpes recomendadas são fornecidas pela FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) órgão responsável pelas pesquisas de seleção, controle de qualidade e manutenção da coleção SEMIA (Seção de Microbiologia Aplicada) desde 1956 (KAMILOVA et al., 2006). Segundo este protocolo os inoculantes devem apresentar no mínimo 1×10^9 células de rizóbio por grama ou mililitro de inoculante. A presença de células não rizobianas é permitida desde que não seja detectada contaminação de até 1×10^{-5} (BASHAN et al., 2014).

O uso de inoculantes na cultura de soja tem sido responsável pela redução do custo de produção; segundo Hungria (2001) a cultura de soja requer a aplicação de 160 kg de nitrogênio por tonelada de grãos. Desta forma o uso de inoculantes resultou na economia de R$ 12,1 bilhões em 2012.

Atualmente as formulações mais utilizadas no mundo são as líquidas, devido à facilidade na aplicação e o menor custo de produção (VARGAS; SUHET, 1980), além de apresentarem menor contaminação que as outras formas (DENARDIN; FREIRE, 2000).

Um veículo de inoculação deve apresentar as seguintes características: fácil obtenção, propriedades constantes, fácil manuseio e processamento, assegurar nutrição e viabilidade das células durante o período de armazenamento (KLOEPPER et al., 2013), ser atóxico, não exigir condições especiais de armazenamento, permitir a aplicação

mecânica, ser de fácil transporte e não ser abrasivo a máquinas e equipamentos (CASSIDY et al. 1996; DENARDIN; FREIRE, 2000; ROUGHLEY, 1970).

Albino e Campo (2001) demonstraram que a maior parte dos produtos comercializados atualmente diminui drasticamente o número de células viáveis de *Bradyrhizobium*. Os fungicidas, quando aplicados nas sementes, reduzem a sobrevivência da bactéria, a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio, uma vez que o veiculo utilizado em suas formulações é muito ácido e diminui a quantidade de células viáveis (CAMPO & HUNGRIA, 1999; CAMPO; HUNGRIA, 2000; CAMPO; HUNGRIA 2002).

Os atuais inoculantes líquidos utilizam o PVP (polivinilpirrolidona) como veículo (LLOYD, 1983), que por apresentarem propriedade adsorvente, interferem na concentração de compostos fenólicos (SEN et al., 2014). Consequentemente diminuem a disponibilidade de isoflavonóides liberados pela planta (KASSEM et al., 2006), importantes mensageiros moleculares que levarão à formação dos nódulos. Desta forma, o PVP é capaz de diminuir a eficiência simbiótica através da adsorção desses sinais. (TITTABUTR, 2007).

A forma polimérica do PVP é inofensiva, porém seu monômero é carcinogênico (ZHAO et al., 2015). Após a lixiviação, o PVP contamina o lençol freático, e seus monômeros contaminam os lagos e rios próximos às plantações de soja prejudicando a vida lacustre. (MOHANTY et al. 2002).

3.6 Desenvolvimento de inoculantes agrícolas mistos

As bactérias que formam nódulos em soja pertencem aos gêneros *Bradyrhizobium* (crescimento lento) e *Ensifer* (crescimento rápido). O uso dessas bactérias é uma alternativa sustentável aos adubos nitrogenados (KAUR et al., 2014).

No Brasil são recomendadas somente quatro estirpes bacterianas para utilização como inoculantes comerciais em soja: *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), consideradas estirpes com alta eficiência na FBN. Existem outras espécies diazotróficas que nodulam soja de modo muito eficiente e que poderiam ser utilizadas como inoculantes, como *Bradyrhizobium diazoefficiens* (PRAKAMHANG et al., 2015), *Ensifer fredii e Ensifer xinjiangens* (HASSEN, 2015), porém carecem estudos com aplicação desses rizóbios em solos brasileiros.

A utilização desses microorganismos diazotróficos co-inoculados com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), pode ser uma importante ferramenta para o aumento da produtividade na sojicultura, com diminuição da dependência de agrotóxicos e fertilizantes químicos, levando a lavoura em direção ao desenvolvimento sustentável (OWEN et al., 2015).

Bacillus subtilis é uma bactéria telúrica que produz hormônios vegetais, como o AIA e AIB (BISHNOI et al., 2005) e secreta enzimas importantes para a nutrição vegetal (POWAR; JAGANNATHAN, 1982). Para Bewley e Black (2012) a acidificação da parede vegetal promovida pela auxina, pode estimular o processo germinativo. Canbolat et al. (2006) demonstraram que a inoculação de *Bacillus subtilis* em trigo e cevada proporcionou aumento na disponibilidade de nutrientes e potencial para o aumento do crescimento das plantas.

Paenibacillus edaphicus é capaz de solubilizar rochas potássicas pela secreção de ácidos orgânicos (BASAK; BISWAS, 2009). De acordo com Mo e Lian (2011) são capazes de produzir quatorze substancias que estimulam o crescimento vegetal e inibir microorganismos patogênicos da raiz (STYRIAKOVA et al., 2003).

Pseudomonas fluorescens são bactérias solubilizadoras de fosfato do solo, tanto inorgânico quanto orgânico. Essas bactérias produzem enzimas fosfatases que liberam os íons fosfato de compostos orgânicos do solo (NAHAS et al., 1994). A solubilização do fósforo inorgânico libera fosfatos e cátions de cálcio e ferro ao solo (ALEXANDER, 1980). O cálcio é um elemento necessário em altas concentrações na fase de encurvamento do pêlo em leguminosas. A carência deste elemento afeta o crescimento da raiz e provoca menor nodulação em leguminosas (CRUSCIOL et al, 2013). *P. fluorescens* produzem antibióticos inibidores de inúmeros patógenos. Brisbane et al (1989) relatam a inibição de dezessete fungos patógenos. A ação biocontrole ocorre graças à presença de sideróforos, substâncias quelantes do íon férrico (LEONG, 1986), que podem aumentar a disponibilidade desses nutrientes à planta de soja.

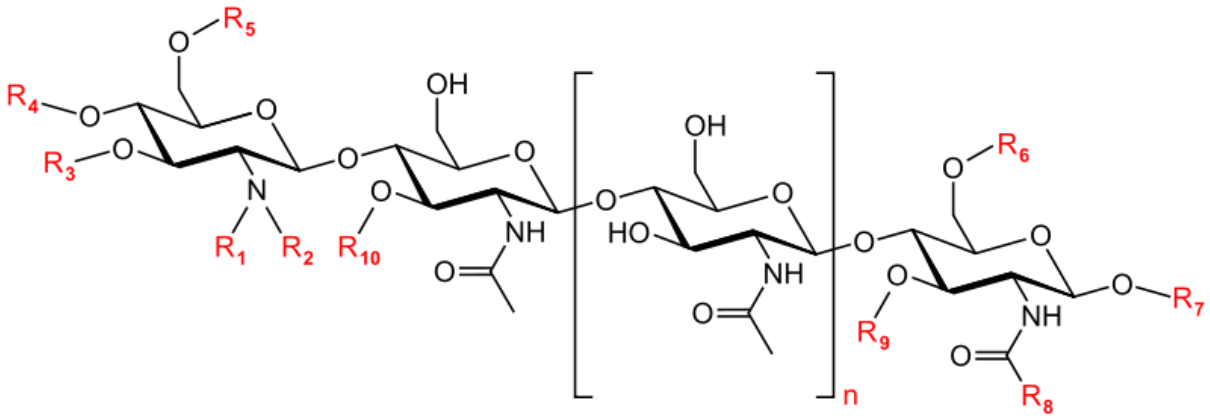
3.7 Fatores Nod

Os fatores Nod são sinais moleculares produzidos por bactérias dos gêneros *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, durante o estabelecimento da simbiose entre rizóbios e fabaceas. A expressão dos

fatores Nod é induzida por sinais moleculares produzidos pelas plantas, geralmente flavonóides e isoflavonóides, encontrados nos exsudatos radiculares (MUÑOZ et al., 2014). A estrutura básica dos fatores Nod, os lipo-quito-oligossacarídeos, pode sofrer diversas modificações moleculares para produzir fatores Nod específicos para cada tipo de rizóbio (OKAZAKI et al., 2015).

Os fatores Nod produzidos por *Bradyrhizobium* e *Ensifer* são moléculas pentaméricas com cadeias de ácidos graxos na extremidade não redutora e 2-O-metilfucose na extremidade redutora da cadeia principal de quitina (D'HAEZE; HOLSTERS, 2002).

Figura 5 - Estrutura geral dos fatores Nod produzidos por rizóbios.



FONTE: D'haeze; Holsters (2002)

Os fatores Nod afetam uma série de processos fisiológicos no hospedeiro, como induzir o encurvamento do pelo radicular (FARUQUE et al., 2015), ontogenia das estruturas nodulares (FLIEGMANN; BONO, 2015) e divisão cortical (LEE et al., 2014). Os fatores Nod também induzem a expressão de genes nodulinos nas plantas, essenciais para a formação do canal de infecção (FERGUSON; MATHESIUS, 2014), além de ativarem enzimas relacionadas com a defesa das plantas (GOURION et al., 2015)

A promoção do crescimento vegetal induzido pelos fatores Nod pode ser causado por efeitos semelhantes aos fitormônios, como a potente indução de divisões celulares por meio da ativação de genes do ciclo celular em plantas (LIANG et al., 2014). A aplicação de fatores Nod purificados em células vegetais resultou em indução da divisão celular no local de contato (BIATE et al., 2014), o que sugere que os fatores Nod são

agentes mitogênicos e provocam o mesmo efeito de citocininas (NAVARRO et al., 2015) Além disso, fatores Nod específicos per se podem induzir a organogênese de um novo nódulo em diversas leguminosas (LIBAULT, 2010), assim como em não-leguminosas (AGUILAR et al., 2015). Os fatores Nod são ativos em uma ampla gama de concentrações (GARCÍA et al., 2014), podendo resultar em germinação precoce de soja (KASSEM, 2004), afetar o crescimento da raiz (STAEHELIN; KRISHNAN, 2015) e acelerar a velocidade de germinação (FERGUSON; MATHESIUS, 2014).

A aplicação de fatores Nod afeta o transporte de auxina (SICZEK et al., 2015), gerando alterações no equilíbrio auxina-citocinina, que resulta em expressivo crescimento e desenvolvimento da planta (DJORDJEVIC et al., 2015).

3.8 Vitamina B12/Cobamamida

A leghemoglobina (Lb*a*) é a única proteína do tipo hemoglobina encontrada no reino vegetal (BHAR et al., 2015). A Lb*a* forma complexos reversíveis com oxigênio, desempenhando um importante papel no difusão desse elemento aos bacteroides, sem desnaturar a nitrogenase (DHURIGAI et al., 2014). A Lb*a* constitui cerca de 10% das proteínas encontradas no citossol dos nódulos (GOPALASUBRAMANIAM et al., 2013). A parte globina é sintetizada no citoplasma da planta, enquanto o grupo heme é sintetizado nos bacteroides, utilizando ácido ð-amino-levulínico (ALA) metabolizado pela planta (NEUDORF, 2015). Heme é um grupo prostético que consiste num átomo de ferro ferroso no centro de um anel de porfirina (BASAK et al., 2015). A sua biossíntese é iniciada pela conversão de propionato à coenzima A do ácido succinico (succinato ativo), catalisada pela metilmalomil coenzima A mutase, que é dependente da coenzima da vitamina B12 (YOUSEIF et al., 2014)O succinato ativo se condensa com moléculas de glicina, resultando na liberação de CO_2 e ALA, catalisada pela ALA sintase. Outra forma de sintetizar o ALA, pode ser a partir do glutamato. A soja sintetiza ALA do glutamato nos nódulos enquanto os bacteroides captam ALA exógeno (PESCE et al., 2011).

No citossol a condensação de duas moléculas de ALA, catalisadas pela ALA desidratase formam o porfobilinogênio (primeiro precursor tetrapirrol) (KIM et al., 2014). A condensação de dois dipirrilmetanos forma o tetrapirrol uroporfirinogênio, que é convertido em copoprofirinogênio pela descarboxilação de todos os grupos

acetatos. A incorporação do ferro ferroso à protoporfirina é catalisada pela enzima ferroquelatase, formando o grupo heme (ZHANG et al., 2015).

Figura 6 - Estrutura molecular da Cobamamida

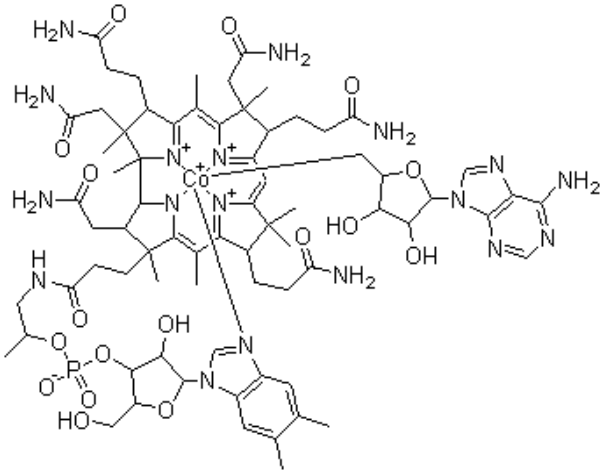
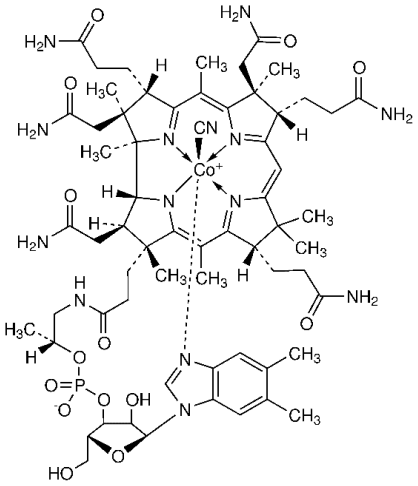


Figura 7 - Estrutura da Vitamina B12



FONTE: Favarin e Marini (2000).

Desta forma a aplicação de cobalto é essencial no cultivo de soja porque este elemento está relacionado à biossíntese de vitamina B12, necessária na formação de leg-hemoglobina (MENGEL; KIRKBY, 2001), porém altas concentrações o cobalto pode resultar em sérios problemas à cultura. Um ensaio realizado por Marcondes e Caíres (2005) verificou que a aplicação de cobalto foi tóxico para a soja em doses acima de 3,4 g/h, o que ocasionou redução superior a 5% no rendimento dos grãos. A altura das plantas de soja foi reduzida linearmente ao aplicar doses crescentes de cobalto (0, 2, 4 e 8 g/ha) via semente. Houve um decréscimo médio de 0,01 m na altura das plantas para cada grama de cobalto aplicado e os teores de zinco nas folhas foram reduzidos.

O cobalto pode influenciar no transporte de ferro para a parte aérea da planta (SREE et al. 2015), o que afeta diretamente o funcionamento da nitrogenase, uma vez que é formada por molibdênio e ferro (WALLACE et al. 1976). A toxicidade dos sais de cobalto em soja, quando aplicada via semente em concentrações acima de 3 g/ha, pode ser percebida alguns dias após a germinação, pois a planta apresenta clorose generalizada, podendo comprometer toda a lavoura, como uma resposta à deficiência de ferro promovida pelo excesso de cobalto (LANTMANN, 2002). Uma alternativa à aplicação de sais de cobalto pode ser a cobamamida, uma coenzima da vitamina B12, que possui o cobalto como componente metálico, ligado a quatro átomos de nitrogênio no centro de uma estrutura de porfirina (FAVARIN; MARINI, 2000).

3.9 Impactos ambientais em agrossistemas

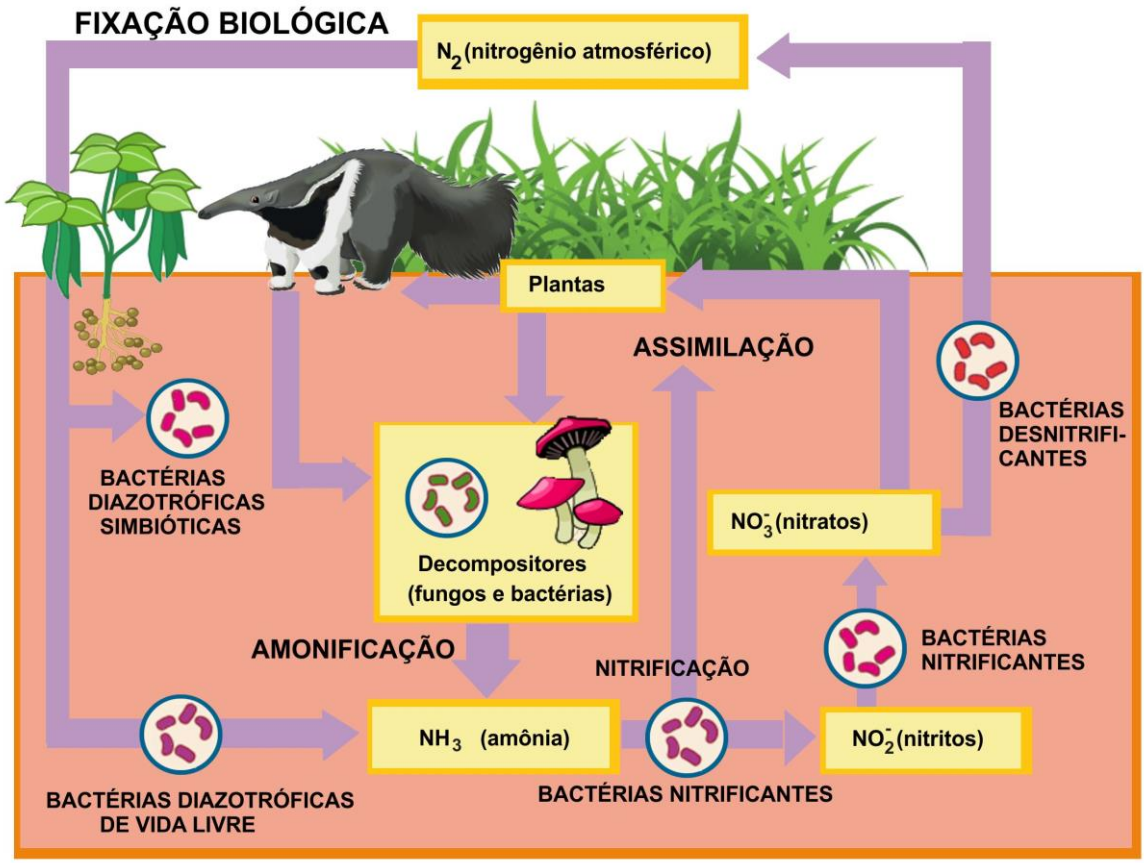
Atualmente a agricultura utiliza grandes quantidades de fertilização nitrogenada, fosfatada e potássica de base química, que possui alto custo e causa sérios impactos ambientais (REDDY, 2015). A obtenção de adubos químicos é dispendiosa, porque o processo industrial requer altas taxas de temperatura e pressão (BACENETTI et al., 2015; TUOMISTO; TEIXEIRA, 2011), por meio do uso de combustíveis fósseis que emitem toneladas de poluentes (CO_2) na atmosfera, causando mudanças climáticas (KURUKULASURIYA; ROSENTHAL, 2013). A aplicação de adubos químicos acarreta na poluição lagos e rios, para onde são drenados os excessos lixiviados pelas chuvas (GONZÁLEZ-RIVERO et al., 2014). Nos rios ocorre o fenômeno da nitrificação, matando a fauna e emitindo gases de efeito estufa, seguido da desnitrificação, que afeta a camada de ozônio (SUTTON; BLEEKER, 2013).

A amônia aumenta a acidez dos solos, alterando a composição química e disponibilidade de nutrientes. Os prejuízos à saúde humana incluem, danos pulmonares, náuseas, dores de cabeça, tosse, irritação das mucosas, entre outros (QI et al., 2012). Há uma sinergia entre os diferentes poluentes, de tal forma que os efeitos ambientais causados por eles, são mais significativos que a somatória de seus efeitos individuais (GENC et al., 2012).

Em função de seus efeitos, ocorre a diminuição da microbiota do solo, inibição da fixação biológica do nitrogênio, intoxicação de diversas cadeias alimentares por bioacumulação, além de problemas nos seres humanos, aumentando risco de morte de fetos, defeitos de nascença, problemas de desenvolvimento neurológico, mudanças hormonais, irritações na pele e mucosas, efeitos carcinogênicos, linfomas não-Hodgkin e leucemia (MORETTO; COLOSIO, 2011).

Estudos estimam que 25 milhões de trabalhadores agrícolas sofram com algum tipo de intoxicação causada por exposição a agrotóxicos no mundo (SHETTY et al., 2011).

Figura 8 – Ciclo biológico do nitrogênio.



FONTE: Baseado no modelo de Qi et al. (2012).

Os fertilizantes nitrogenados em excesso, tem grande influencia no equilíbrio do ciclo do nitrogênio (Figura 5), causam poluição lacustre, e quando alcançam os mares e oceanos estimulam o crescimento de fitoplâncton. A diminuição de oxigênio dissolvido na água leva ao surgimento de áreas hipóxicas, exterminando peixes, ovas, larvas e crustáceos. A destruição do ecossistema também resulta em poluição e destruição dos mananciais (FOURQUEZ et al., 2014).

Atualmente metade do desmatamento em florestas tropicais foi causado por atividades agrícolas (HERES et .al, 2013). A solução para diminuir o desmatamento sem comprometer o aumento da produção agrícola é o desenvolvimento de novas ferramentas tecnológicas capazes de aumentar o rendimento dos cultivos e promover a recuperação de regiões degradadas (CHRISTENSEN, 2013). A aplicação de pacotes biotecnológicos nas culturas agrícolas pode ser um importante passo em direção à produção sustentável, protegendo o solo, com estímulo e reestabelecimento da microbiota e aumento de sua biodiversidade (ZAIDI et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inoculantes agrícolas mistos

Foram selecionadas sete bactérias de conhecido interesse agronômico, para serem combinadas entre si, de forma que fossem aplicadas às sementes de soja inoculantes que apresentassem sinergia na promoção de melhor desenvolvimento da planta. Foram combinados inoculantes contendo bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio nodulantes de soja (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Ensifer fredii*) e inoculantes com bactérias associativas (*Bacillus subtilis*, *Paenibacillus edaphicus* e *Pseudomonas fluorescens*). Inicialmente foram avaliadas as interações entre essas bactérias *in vitro*. As combinações nas quais não foram observadas interações negativas entre os microrganismos foram aplicadas à soja (*in vivo*) para avaliar o efeito na nodulação e desenvolvimento das plantas.

4.1.1 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vitro)

As bactérias utilizadas em culturas mistas nos ensaios foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura (tabela 1) .

Tabela 1. Estirpes bacterianas, suas respectivas coleções bacterianas e meios de cultura utilizados.

Espécie	Linhagem	Coleção	Meio de Cultura
B. japonicum	SEMIA 5080	Coleção SEMIA de Rizóbios, FEPAGRO, Porto Alegre, RS.	Manitol levedura modificado I (tabela 2)
B. elkanii	SEMIA 5019	Coleção SEMIA de Rizóbios, FEPAGRO, Porto Alegre, RS.	Manitol levedura modificado I (tabela 2)
E. fredii	SMH12	Departamento de Química da Universidade Nacional de La Pampa, Argentina.	Manitol levedura modificado II (tabela 3)
P. edaphicus	VKPM B 7517	Coleção Russa de Microrganismos de Interesse Industrial, Rússia.	Aleksandrov (tabela 5)
B. subtilis	ATCC 55567	ATCC, Estados Unidos.	Batata dextrose (tabela 6)
P. fluorescens	ATCC 17552	ATCC, Estados Unidos.	king B (tabela 7)

Tabela 2. Composição do meio de cultura manitol levedura modificado I.

Composto	Concentração Final por L
Extrato de Levedura	2 g
Glutamato monossódico	2 g
Manitol	10 g
K_2HPO_4	0,75 g
KH_2PO_4	0,6 g
NaCl	0,1 g
KNO_3	0,8 g
Solução de Micronutrientes (tabela 5)	10 ml

Tabela 3. Composição do meio de cultura manitol levedura modificado II.

Composto	Concentração Final por L
Extrato de Levedura	4 g
Manitol	10 g
K_2HPO_4	0,75 g
NaCl	0,1 g
Solução de Micronutrientes (tabela 5)	10 ml

Tabela 4. Composição da solução de micronutrientes.

Composto	Concentração Final $g.L^{-1}$
$ZnSO_4.7H_2O$	0,22
$CaCl_2$	0,55
$MnCl_2$	0,5
$FeSO_4$	0,5
$(NH_4)6Mo7O_{24}.4H_2O$	0,1
$CuSO_4$	0,16
$CoCl_2$	0,16

Tabela 5. Composição do meio de cultura Aleksandrov.

Composto	Concentração Final $g.L^{-1}$
Sacarose	10
K_2HPO_4	2
MgSO4.7H2O	0,5
FeCl3	0,01
CaCO3	0,1
NaCl	0,2

Tabela 6. Composição do meio de cultura Batata Dextrose.

Composto	Concentração Final $g.L^{-1}$
Infusão de Batatas	200
Dextrose	20

Tabela 7. Composição do meio de cultura king B.

Composto	Concentração Final $g.L^{-1}$
Peptona protease	20 g
Glicerol	15 ml
KH_2PO_4	1,5 g
MgSO4. 7H2O	1,5 g
Solução de Micronutrientes	10 ml
Peptona protease	20 g
Glicerol	15 ml
KH_2PO_4	1,5 g
MgSO4. 7H2O	1,5 g

A seleção *in vitro* das culturas mistas foi realizada combinando as bactérias simbióticas e associativas. Inicialmente foram avaliadas as bactérias simbióticas (tabela 8), e em seguida as bactérias associativas (tabela 9).

Tabela 8. Culturas puras e co-culturas de *B. japonicum* SEMIA 5080, *B. elkani* SEMIA 5019 e *E. fredii* SMH12.

Tratamentos com *B. japonicum*	Tratamentos com *B. elkanii*	Tratamentos com *E. fredii*
1. Cultura pura de *B. japonicum*	1. Cultura pura de *B. elkanii*	1. Cultura pura de *E. fredii*
2. *B. japonicum* + *P. edaphicus*	2. *B. elkanii* + *P. edaphicus*	2. *E. fredii* + *P. edaphicus*
3. *B. japonicum* + *B. subtilis*	3. *B. elkanii* + *B. subtilis*	3. *E. fredii* + *B. subtilis*
4. *B. japonicum* + *P. fluorescens*	4. *B. elkanii* + *P. fluorescens*	4. *E. fredii* + *P. fluorescens*

Tabela 9. Culturas puras e co-culturas de *P. edaphicus* VKPM B 7517, *B. subtilis* ATCC 55567e *P. fluorescens* ATCC 17552.

Tratamentos com *P. fluorescens*	Tratamentos com *B. subtilis*	Tratamentos com *P. edaphicus*
1. Cultura pura de *P. fluorescens*	1. Cultura pura de *B. subtilis*	1. Cultura pura de *P. edaphicus*
2. *P. fluorescens* + *B. japonicum*	2. *B. subtilis* + *B. japonicum*	2. *P. edaphicus* + *B. japonicum*
3. *P. fluorescens* + *B. elkanii*	3. *B. subtilis* + *B. elkanii*	3. *P. edaphicus* + *B. elkanii*
4. *P. fluorescens* + *E. fredii*	4. *B. subtilis* + *E. fredii*	4. *P. edaphicus* + *E. fredii*

Tabela 10. Culturas puras e co-culturas entre *P. edaphicus* VKPM B 7517, *B. subtilis* ATCC 55567 e *P. fluorescens* ATCC 17552.

Tratamentos com *P. fluorescens*	Tratamentos com *B. subtilis*	Tratamentos com *P. edaphicus*
1. Cultura pura de *P. fluorescens*	1. Cultura pura de *B. subtilis*	1. Cultura pura de *P. edaphicus*
2. *P. fluorescens* + *P. edaphicus*	2. *B. subtilis* + *P. edaphicus*	2. *P. edaphicus* + *B. subtilis*
3. *P. fluorescens* + *B. subtilis*	3. *B. subtilis* + *P. fluorescens*	3. *P. edaphicus* + *P. edaphicus*

B. japonicum (27 ml de inóculo) foi cultivado em frascos 500 ml, contendo 243 ml de meio manitol levedura modificado I, agitado até alcançar 1x 10^4 cél/ml (Figura 4). *P.edaphicus, B. subtilis* e *P. fluorescens* cresceram em 300 ml de seus respectivos meios (tabela 1) até alcançar 1 x 10^4 cél/ml, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 30 ml de cada meio. As co-culturas foram realizadas inoculando as células ressuspensas à 270 ml de meio manitol levedura modificado contendo *B. japonicum* (Figura 4). Alíquotas de 1 ml da cultura foram retiradas a cada 30h para determinar as unidades

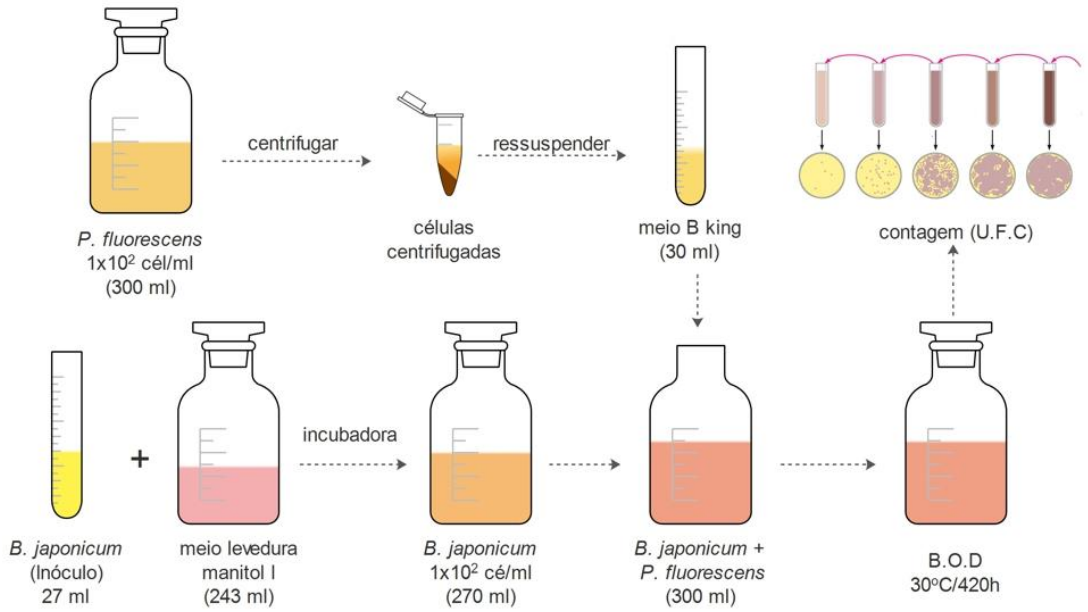
formadoras de colônias (UFC). Foram realizadas diluições decimais sucessivas, em triplicata, de 1 ml até alcançar 10^{-12}. Alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas em placas de petri contendo meio sólido levedura-manitol modificado I e espalhadas com alças de Drigalski. Foram realizadas triplicatas das diluições e incubadas às temperaturas indicadas na tabela 11, por 1440h. Como as bactérias das co-culturas apresentavam colônias morfologicamente distintas, a contagem dos co-inoculados não apresentou problemas. As outras combinações (tabelas 8, 9 e 10) seguiram o mesmo método descrito para *B. japonicum*.

Tabela 11. Condições de cultivo das linhagens utilizadas

Linhagem	T º C	Agitação	pH
Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080	30ºC	250 rpm	6,8
Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080	30ºC	250 rpm	6,8
Ensifer fredii SMH12	30ºC	120 rpm	7,2
Paenibacillus edaphicus VKPM B7517	30ºC	100 rpm	7,5
Bacillus subtilis ATCC 55567	28ºC	100 rpm	6,5
Pseudomonas fluorescens ATCC 17552	27ºC	100 rpm	7,2

(LOPRETO et al., 1972).

Figura 9 . Esquema do ensaio de crescimento em culturas mistas.



4.1.2 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vivo)

As combinações bacterianas selecionadas no ensaio *in vitro* foram aplicadas à soja. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se a cultivar de soja BRS 133. As sementes foram desinfetadas segundo método descrito por Vincent et al. (1970). Foram utilizados vasos de Leonard de 1 litro, contendo como substrato areia e vermiculita na proporção de 2:1, autoclavado por uma hora, a 120ºC. Foram plantadas sete sementes por vaso e após uma semana foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. A colheita foi realizada 45 dias após a emergência, no florescimento (estádio R_2). O ensaio foi realizado nos meses de outubro e novembro de 2011. A irrigação foi efetuada por capilaridade, utilizando solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Foram avaliados : Altura das plantas (AP), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN). O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso com 18 tratamentos e dez repetições.

Tabela 12. Tratamentos para avaliação de culturas mistas aplicadas em soja.

	Tratamentos
1	Controle 1- Sem inoculação , sem nitrogênio.
2	Controle 2 - Sem inoculação, com amônia.
3	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587 (comercial 1)
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079 (comercial 2)
5	*B. elkanii* SEMIA 5019
6	*B. japonicum* SEMIA 5080
7	*E. fredii* SMH12
9	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *P. edaphicus* VKPM B7517
10	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. subtilis* ATCC 55567
11	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *P. fluorescens* ATCC 17552
13	*E. Fredii* SMH12+ *P. edaphicus* VKPM B7517
14	*E. Fredii* SMH12+ *B. subtilis* ATCC 55567
15	*E. Fredii* SMH12+ *P. fluorescens* ATCC 17552
16	*B. elkanii* SEMIA 5019 + *P. edaphicus* VKPM B7517
17	*B. elkanii* SEMIA 5019 + *B. subtilis* ATCC 55567
18	*B. elkanii* SEMIA 5019 + *P. fluorescens* ATCC 17552

4.2 Fatores Nod

Foram realizados testes para produção dos fatores Nod pelas bactérias simbiontes (*B. japonicum* e *E. fredii*) em laboratório, para compor a primeira tecnologia aplicada ao inoculante do pacote tecnológico. O efeito da aplicação dos fatores Nod foi avaliado em plântulas (câmara de geminação) e no desenvolvimento da soja (casa-de-vegetação).

4.2.1 Produção e quantificação de fatores Nod

O inóculo contendo *Ensifer fredii* SMH12 foi adicionado ao meio de cultura manitol levedura modificado II, na proporção de 1/9 (10 ml de inóculo em 90 ml de meio de cultura), pH 7,2 sob agitação orbital de 120 rpm a 30ºC por 168 h. O mesmo procedimento foi realizado com o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080, que cresceu em meio manitol levedura modificado I, pH 6,8 a 30ºC , agitação de 250 rpm, por 168 h. Para cada mililitro de meio foram adicionados 50 µM de genisteína (98%, Sigma), 50 µM de daidzeína (Fluka), 60 mg de isoflavonas de soja (NuHealth Pure), 20 µM de ácido jasmônico, 20 µM de metil jasmonato e 20 µM de ácido acetilsalicílico, seguindo as combinações descritas na tabela 13, em 12 tratamentos com 4 repetições.

Tabela 13. Descrição dos diferentes tratamentos para avaliar a produção de fatores Nod por *E. fredii* SMH12 e *B. japonicum* SEMIA 5080.

Tratamentos	Composição
1	Genisteína
2	Daidzeína
3	Isoflavonas de soja
4	Genisteína + ácido jasmônico
5	Daidzeína + ácido jasmônico
6	Isoflavonas de soja + ácido jasmônico
7	Genisteína + metil jasmonato
8	Daidzeína + metil jasmonato
9	Isoflavonas de soja + metil jasmonato
10	Genisteína + ácido acetilsalicílico
11	Daidzeína + ácido acetilsalicílico
12	Isoflavonas de soja + ácido acetilsalicílico

Para extração de fatores Nod dissolvidos no meio de cada tratamento, foi utilizada resina XAD02 (Alltech, XAD-1180 20/60), colocada no funil de filtragem à vácuo, seguido protocolo de Stacey et al. (2006). A quantificação dos fatores Nod foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se uma coluna C18, Vydac 5 μM 300 A (dp de 5um, ID de 4,6 mm e 150 mm de comprimento) e pré-filtro 218TP54 4.6 x 250 mm. Como fase móvel foi solução de acetonitrila/ água (18:82) e programa de eluição seguiu a tabela 14, com tempo total de corrida de 45 minutos e fluxo de 1,0 ml/min.

Tabela 14. Concentração das soluções nos diferentes tempos de corrida.

Tempo	Concentração das soluções
10 – 30 minutos	18% a 60% de acetonitrila
30-35 minutos	60% a 100 % de acetonitrila
35-40 minutos	100% a 18% de acetonitrila
40-45 minutos	18% acetonitrila

O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação a 210 nm e emissão a 410 nm. Foram injetados 50 uL de cada amostra contendo os fatores Nod. As áreas dos picos de retenção e a concentração foram quantificados com seu padrão.

4.2.2 Avaliação de plântulas de soja com fatores Nod

Inicialmente foi verificada a presença de fungos nas sementes pelo teste de sanidade, pelo método do papel-filtro. Para tanto, 50 sementes foram colocadas em placas de petri, sobre 3 folhas de papel filtro e umedecidas com água destilada estéril. Em seguida, foram incubadas em câmara B.O.D a 25 ºC durante sete dias, obedecendo o regime de 12 horas sob luz (lâmpadas florescentes) e 12 horas no escuro.

Foram avaliados os fungos presentes nas sementes após esse período, por meio de microscópio estereoscópico.

Após desinfecção das sementes foi realizado o teste de germinação. Para este teste foram utilizadas 60 sementes por tratamento em papel toalha contendo água (2,5 vezes o peso do papel) e mantidos durante uma semana em câmara de germinação a 25ºC. Nestes ensaios foram utilizadas sementes de soja, cultivar BRS-154 que receberam 8 tratamentos, conforme descrito na tabela 15.

Tabela 15. Tratamentos para avaliar o efeito dos fatores Nod no desenvolvimento das plântulas de soja.

	Tratamentos
1	Controle - Sem inoculação e sem fertilizante nitrogenado
2	Aplicação de amônia, sem inoculação
3	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587
5	*B. japonicum* SEMIA 5080
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores NOD
7	*E. fredii SMH12*
8	*E. fredii SMH12* + Fatores NOD

A germinação foi avaliada aos 4 e 7 dias após a semeadura.

O teste de vigor (capacidade de germinação) foi realizado em bandejas plásticas contendo uma camada de areia de 11 cm. Foram feitas 6 repetições sendo que para cada tratamento utilizaram-se 60 sementes. As sementes foram semeadas a 3 cm de profundidade, com ajuste de 60% de umidade do substrato. Após 20 dias em casa de vegetação foi determinada a velocidade de germinação, segundo fórmula de Maguire (1962):

$$VG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \cdots \frac{Gn}{Nn}$$

VG = índice de velocidade de germinação

G1,G2,G*n* = Número de plântulas normais na primeira, segunda e n-ésima.

N1, N2, N*n* = Número de dias entre a semeadura e a primeira, segunda e n-ésima contagem.

O índice é dado em plântulas.dia $^{-1}$.

A massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas, foi avaliada em 20 amostras, com 5 repetições. A soja foi avaliada após 4 dias da semeadura em bandeja contendo areia com 60% de umidade. Após a coleta, foram medidos os comprimentos das plântulas, em seguida foram colocadas em estufa (60ºC) para determinar a massa seca.

4.2.3 Avaliação do desenvolvimento da soja com fatores Nod

O ensaio foi desenvolvido em campo de cultivo experimental, localizado em Bragança Paulista. O solo da unidade experimental se caracteriza como latossolo vermelho distroférrico típico, bem drenado, perfil profundo, com altos teores de argila e predominância de argilominerais 1:1, alumínio e oxi-hidróxidos de ferro. A área de plantio tem semeadura direta consolidada, implantado sobre precedente cultura de milho.

O estudo foi realizado de outubro de 2012 a abril de 2013 (safra agrícola 2012/2013), com delineamento de blocos ao acaso, com dez repetições. As unidades experimentais são parcelas de dez fileiras com dez metros de comprimento e espaçamento de 0,5 m entre as fileiras. Consideram-se como parcela útil as seis fileiras centrais.

A semeadura foi realizada no mês de novembro. Foram utilizadas doze sementes por metro linear, com profundidade de 5 cm. A cultivar utilizada foi a M-SOY 6101, de crescimento indeterminado, altura média de 100 cm, acamamento moderadamente resistente.

No ensaio foram empregados os tratamentos da tabela 16.

Tabela 16 . Tratamentos empregados para avaliar o efeito dos fatores no desenvolvimento da soja.

	Tratamentos
1	Sem inoculação , sem nitrogênio.
2	Sem inoculação, com amônia.
3	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587
5	*B. japonicum* SEMIA 5080
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores Nod
7	*E. fredii* SHM12
8	*E. fredii* SHM12 + fatores Nod

Aos 105 dias após a semeadura foi realizada a colheita para avaliação dos parâmetros :

- Número de grãos por vagem (NGV). Foi contado o número de grãos por planta, que foi dividido pelo número de vagens (unidade).
- Massa média dos grãos (MMG). Foram separados ao acaso mil grãos de cada amostra, seguido de pesagem (grama).
- Rendimento dos grãos (RG) Foram pesadas dez plantas de cada repetição e subtraiu-se a massa dos grãos (kg/ha).
- índice de colheita (IC): Calculado segundo a equação abaixo:

$$IC = \frac{PG}{RBA} \,.\, 100$$

Onde : PG = Produção de grãos

RBA = Rendimento Biológico Aparente

Resultado é dado em porcentagem. Para o cálculo do RBA, foram somados o rendimento da massa seca + rendimento de grãos.

4.3 Vitamina B12/cobamamida

A segunda tecnologia aplicada ao inoculante foi produzida em laboratório pelas bactérias simbiontes (*B. japonicum* e *E. fredii*). Foi avaliado o efeito na nodulação da soja da aplicação da vitamina B12 produzida pelas bactérias e a adição desse composto e sua coenzima (cobamamida) ao inoculante, em diferentes concentrações.

4.3.1 Produção e quantificação de vitamina B12

Ensifer fredii SMH12 foi cultivado em meio manitol levedura modificado II, enquanto o *B. japonicum* SEMIA 5080 foi cultivado em meio manitol levedura modificado I. Para induzir a produção de vitamina B12 foram adicionados aos meios os 3 compostos da tabela 16. Foram adicionados 10 ml de cada inóculo em 90 ml dos respectivos meios de cultura, em frascos de 250 ml. *B. japonicum* foi cultivado em pH 6,8, sob agitação de 120 rpm a 28 ºC, por 168 h, enquanto *E. fredii* foi cultivado sob agitação orbital de 120 rpm, pH 7,2 a 30ºC por 168 h (YOSHIDA, 1998).

Tabela 17 . Substâncias adicionadas ao meio de cultura para síntese de vitamina B12.

Componente	Concentração g/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,1
Cloreto de colina	10
5,6 dimetilbenzamidazol	0,025

Para a extração de vitamina B12 as células de *Ensifer fredii* SMH12 e *B. japonicum* SEMIA 5080 foram suspensas em ácido acético (5N) e o meio foi ajustado a pH 5,0. Foi adicionado KCN na concentração de 100 μg/ml, em seguida foi misturado e aquecido a 100 °C por 15 minutos. Após resfriar, o precipitado foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi armazenado para posterior quantificação da vitamina B12 por HPLC. Foram injetados 10 μL do sobrenadante.

A avaliação quantitativa de vitamina B12 foi realizada por HPLC, utilizando-se coluna de fase reversa C18 (4,6mm x 250 mm, 5um) (Asahi Chemical Industry Co., Japão). Como fase móvel foi utilizada 0.05 $mol.L^{-1}$ de solução tampão de fosfato de potássio (ajustado com ácido fosfórico ao pH 3.2): acetonitrila (83:17). O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação de 260 nm. Foram injetados 10 μL de cada amostra, a uma taxa de 1.0 $mL.min^{-1}$. As áreas dos picos de retenção e a concentração foram quantificados com padrão de vitamina B12.

4.3.2 Avaliação da aplicação de cobamamida e vitamina B12 na nodulação da soja

Para a avaliação do efeito da aplicação da cobabamida e vitamina B12 na nodulação da soja foram utilizados vasos de Leonard, contendo areia, carvão ativo e meio nutritivo isento de nitrogênio. Os vasos foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm por 2 horas. Semearam-se cinco sementes de soja pré-germinadas e previamente desinfetadas em cada vaso. Foram plantadas sete sementes por vaso e após uma semana foi realizado o desbaste para uma planta por vaso. A coleta foi realizada aos 45 dias após a emergência da planta.

O delineamento experimental foi de blocos completos casualizados com 18 repetições conforme a tabela 18.

Tabela 18 . Tratamentos empregados para avaliar o efeito da vitamina B12 e cobamamida na nodulação da soja.

	Tratamentos
1	Sem inoculação e sem nitrogênio
2	Sem inoculação e com amônia
3	*B. japonicum* SEMIA 5080
4	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 produzida pela bac. (0,7 μg/ml)
5	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (1 mg/ml)
6	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (1 mg/ml)
7	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (1,5 mg/ml)
8	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (1,5 mg/ml)
9	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (2 mg/ml)
10	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (2 mg/ml)
11	*E. fredii SMH12*
12	*E. fredii SMH12*+ vitamina B12 produzida pela bactéria (1,9 μg/ml)
13	*E. fredii SMH12+* vitamina B12 (1 mg/ml)
14	*E. fredii SMH12+* cobamamida (1 mg/ml)
15	*E. fredii SMH12+* vitamina B12 (1,5 mg/ml)
16	*E. fredii SMH12+* cobamamida (1,5 mg/ml)
17	*E. fredii SMH12+* vitamina B12 (2 mg/ml)
18	*E. fredii SMH12+* cobamamida (2 mg/ml)

Foram analisados três parâmetros: número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea da planta (MSPA) .

4.4 Pacote biotecnológico

4.4.1 Avaliação do pacote biotecnológico no rendimento da soja em campo

O ensaio foi conduzido entre os meses de outubro de 2013 e abril de 2014, na fazenda Fortaleza em Bragança Paulista – SP.

As sementes da variedade M-SOY 6101 foram desinfetadas por imersão em álcool 70% por 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio a 10% por 5 minutos, em seguida foram lavados em água destilada e deixadas para secar em BOD. O delimento experimental foi em blocos ao acaso. A soja foi semeada em cinco linhas de 0,45 cm de espaçamento por 10 m de comprimento.

Tabela 19. Tratamentos para avaliação da aplicação de fatores Nod, cobamamida e diferentes co-inoculações no rendimento de soja.

	Tratamentos
1	Controle 1- Sem inoculação , sem nitrogênio.
2	Controle 2 - Sem inoculação, com amônia.
3	*B. japonicum* SEMIA 5080
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079 (comercial 1)
5	*B. elkanii* SEMIA 587 +SEMIA 5019 (comercial 2)
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587 (comercial 3)
10	*E. fredii* SMH12+ cobamamida (1 mg/ml)
11	*E. fredii* SMH12+ Fatores Nod
12	*E. fredii* SMH12+ cobamamida (1 mg/ml) + Fatores Nod
13	*E.fredii* SMH12 *+ P.edaphicus* VKPM B7517
14	*E.fredii* SMH12 *+ P. fluorescens* ATCC17552
14	*E.fredii* SMH12 *+ P.edaphicus* VKPM B7517 + cobamamida
15	*E.fredii* SMH12 *+ P.edaphicus* VKPM B7517 + Fatores Nod
16	*E.fredii* SMH12 *+ P.edaphicus* VKPM B7517 + Fatores Nod + cobamamida
17	*E.fredii* SMH12 *+ P. fluorescens* ATCC17552+ cobamamida
18	*E.fredii* SMH12 *+ P. fluorescens* ATCC17552+ Fatores Nod
19	*E.fredii* SMH12 *+ P. fluorescens* ATCC17552+ Fatores Nod + cobamamida

Foram avaliadas as 3 linhas centrais e igualmente foi descartado 1 m de bordadura de cada linha. A soja recebeu os tratamentos descritos na tabela 19, com 30 repetições. A colheita foi realizada no dia 11 de abril de 2014, manualmente, para a avaliação dos parâmetros (tabela 19). Os grãos foram corrigidos para 13% de umidade e convertidos em quilograma por hectare (kg/ha).

Tabela 20. Parâmetros avaliados no estudo do efeito do novo inoculante e tecnologias no desenvolvimento da soja.

Sigla	Descrição dos parâmetros avaliados
APV	Altura média da inserção da primeira vagem, expressa em cm, obtida pela medição da distância do colo até a inserção da primeira vagem;
ALT	Altura de plantas: medida da altura das plantas, correspondendo à distância do colo até o final da haste principal, na data da última colheita, expressa em cm;
NMVP	Número médio de vagens por planta (NMVP);
PMV	Peso médio de vagens por planta (PMV), obtido pela razão entre o peso total de vagens e o número de plantas, expresso em g;
CMV	Comprimento médio da vagem (CMV), expresso em cm, obtido pela quantificação do comprimento longitudinal de uma amostra de dez vagens por planta;
NMGV	Número médio de grãos por vagem (NMGV), obtido pela contagem do número de sementes em uma amostra de dez vagens por planta;
PV	Produtividade média de vagens (Prod. Vagens) expresso em kg ha^{-1} de vagens frescas;
Prod. Grãos	Produtividade de grãos (Prod. Grãos) expresso em kg ha^{-1} de grãos secos.

5 RESULTADOS

5.1 Inoculantes agrícolas mistos

5.1.1 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vitro)

As bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas que formam nódulos em soja (*B. japonicum*, *B. elkanii* e *E. fredii*) foram combinadas com microrganismos *PGP*s (*P. fluorescens, P. edaphicus* e *B. subtilis*) afim de desenvolver um novo pacote biotecnólogico para sementes de soja.

A figura 5 mostra as curvas de crescimento de *B. japonicum* em cultura pura e em presença das bactérias *PGP*s. Em cultura pura e em combinação com *P. fluorescens* e *P. edaphicus*, *B. japonicum* apresentou tempo de geração de 9 h e uma concentração máxima de 2,5 x x 10^{12} cél/ml. Quando foram adicionados à cultura do *B. japonicum* as bactérias *P. fluorescens*, *P. edaphicus* ou *B. subtilis*, observou-se uma clara intervenção no crescimento do *B. japonicum* sobretudo em relação ao título da cultura na fase estacionária. No caso da cultura com *B. subtilis* o título máximo atingido foi ao redor de 10^7 cél/ml e marcante queda na viabilidade de *B. japonicum* a partir das 160 horas de co-cultivo, chegando a mortalidade total ao redor das 450 h. Na cultura mista com *P. edaphicus*, *B. japonicum* apresentou concentração máxima de 6 x 10^{11} cél/ml. A fase estacionária estabeleceu-se após uma queda no título da cultura, após 180h de cultivo, o mesmo ocorreu quando foi adicionada *P. fluorescens* no meio de cultura de *B. japonicum*. A concentração máxima foi torno de 5 x 10^{10} cél/ml e diminuiu para 3 x 10^8 cél/ml quando alcançou a fase estacionária.

A curva de crescimento de *B. elkanii* (figura 11) dos quatro tratamentos mostrou-se similar àquela observada em *B. japonicum*. Quando em cultura pura, o cultivo alcançou concentração máxima de 1,2 x 10^{12} cél/ml e na fase estacionária, ocorreu uma queda no título da cultura, mantendo-se ao redor de 8 x 10^{10} cél/ml.

A figura 12 mostra o crescimento de *E. fredii* cultivado na presença de *P. fluorescens*, *P. edaphicus* e *B. subtilis*. As culturas puras de *E. fredii* apresentaram as maiores concentrações (6 x 10^{12} cél/ml), atingindo a fase estacionária após 90 h.

Figura 10 – Curvas de crescimento de ***B. japonicum*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*.

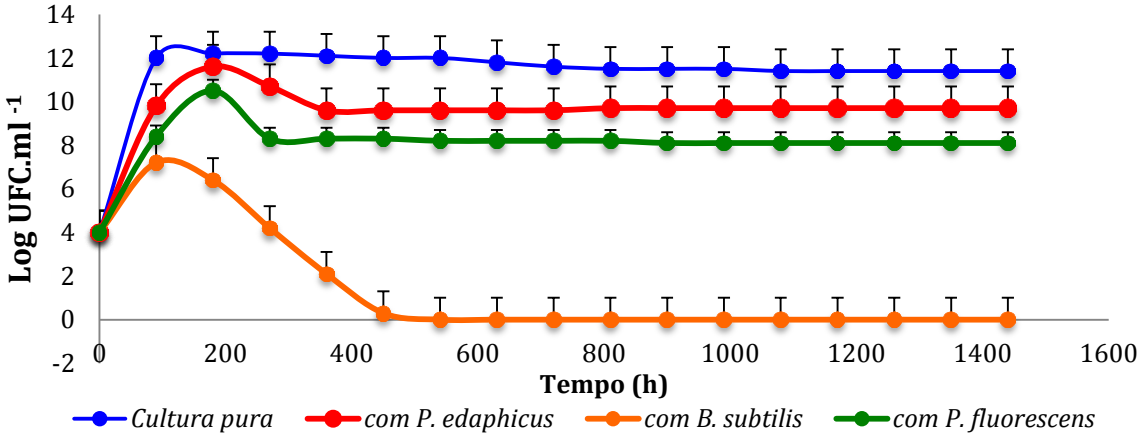


Figura 11 – Curvas de crescimento de ***B. elkanii*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*.

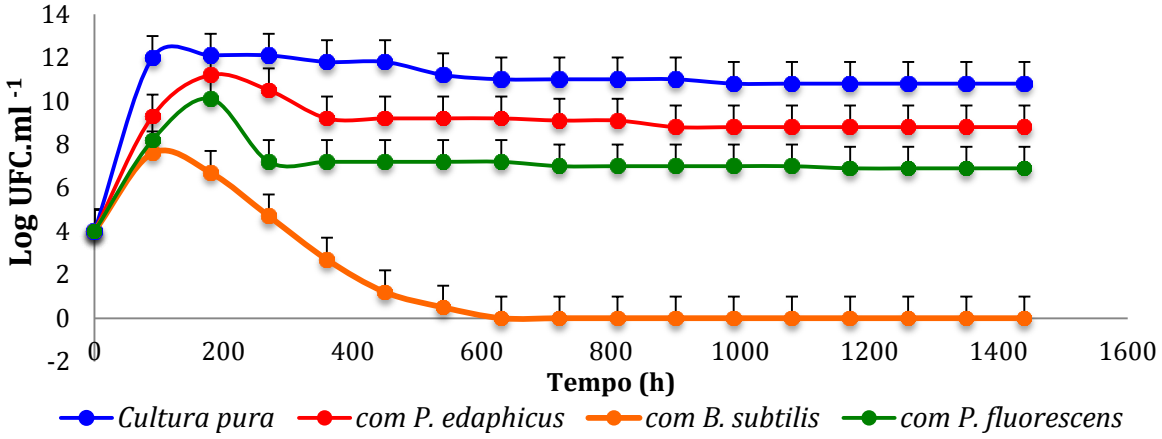


Figura 12 – Curvas de crescimento de ***E. fredii*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. edaphicus*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*.

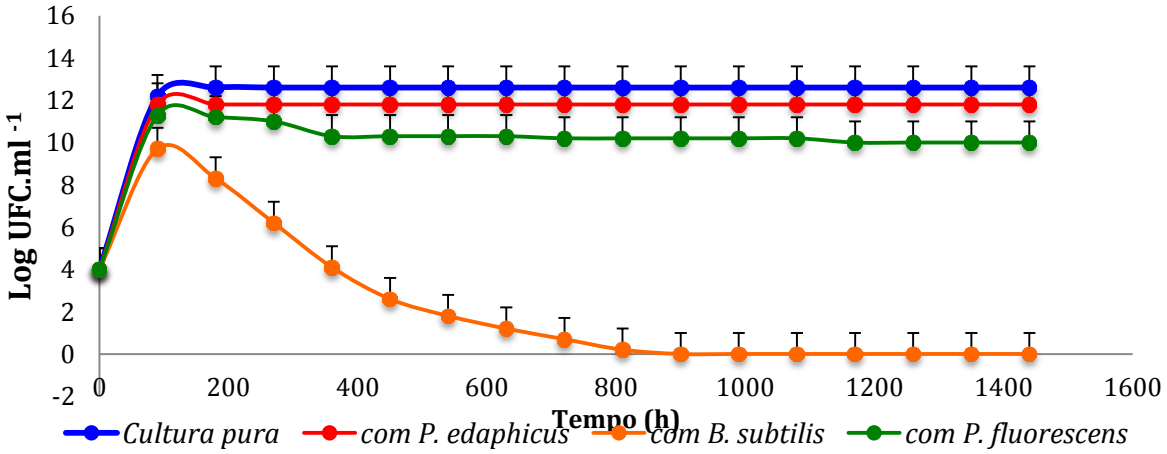


Figura 13 – Curvas de crescimento de ***P. fluorescens*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii.*

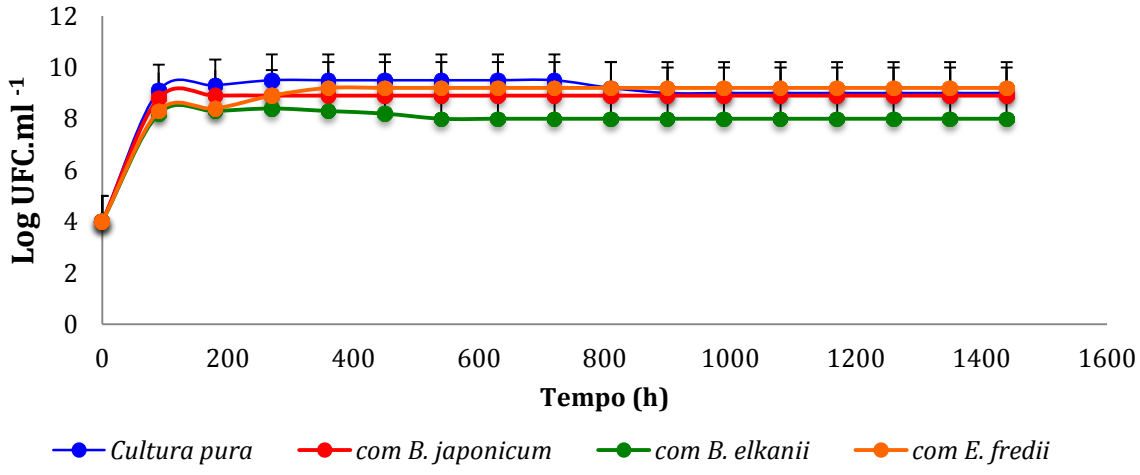


Figura 14 – Curvas de crescimento de ***B. subtilis*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii.*

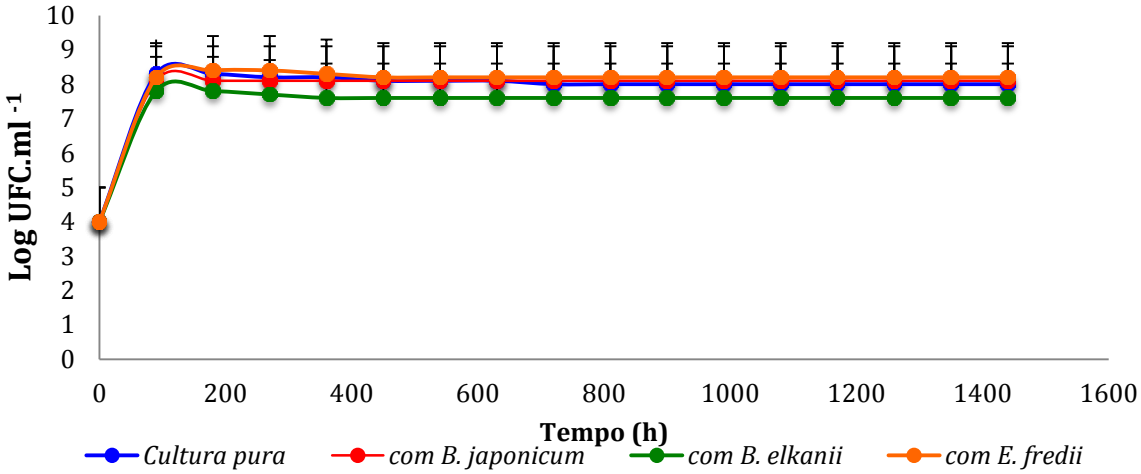


Figura 15 – Curvas de crescimento de ***P. edaphicus*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii.*

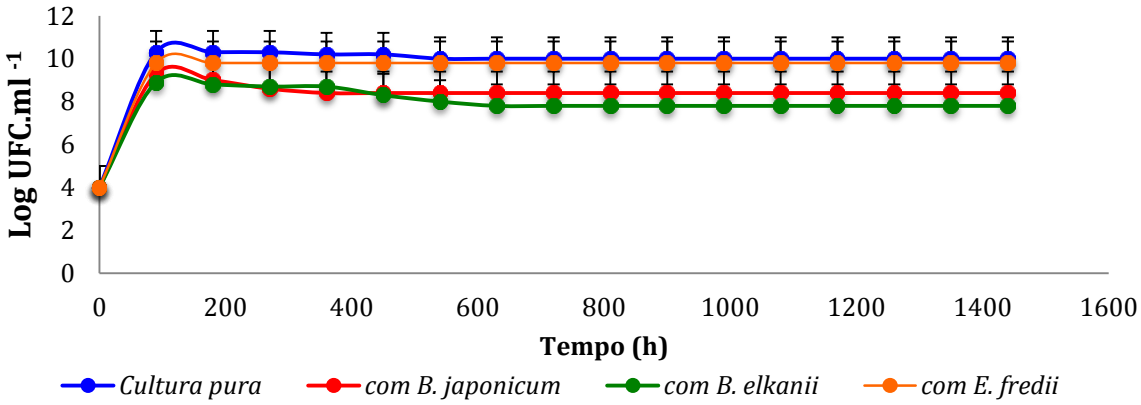


Figura 16 – Curvas de crescimento de ***P. fluorescens*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. subtilis e P. edaphicus.*

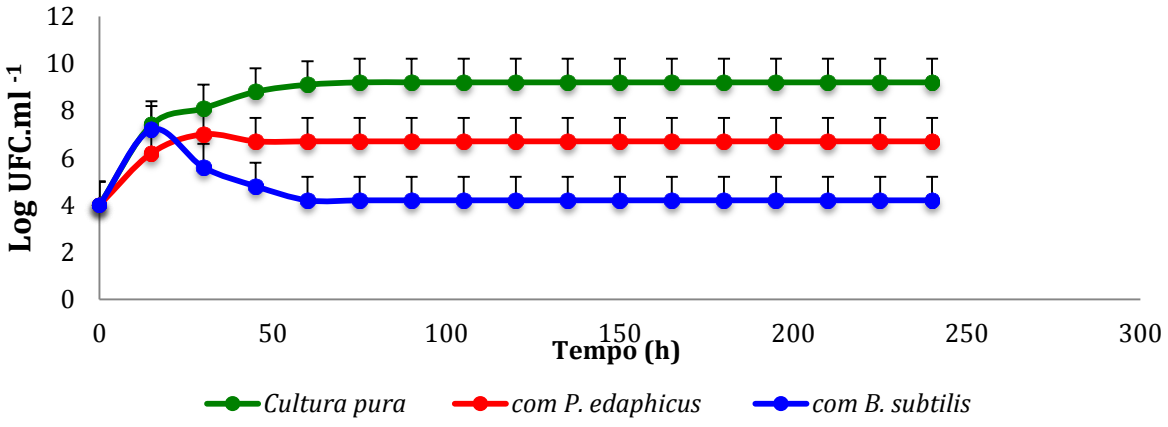


Figura 17 – Curvas de crescimento de ***B. subtilis*** em cultura pura e cultivado na presença de *P. fluorescens e P. edaphicus*

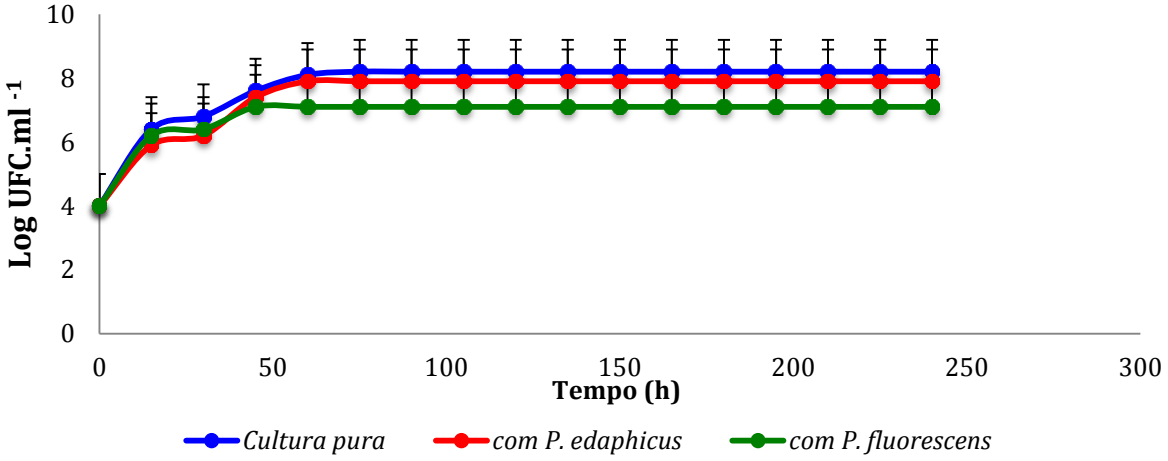
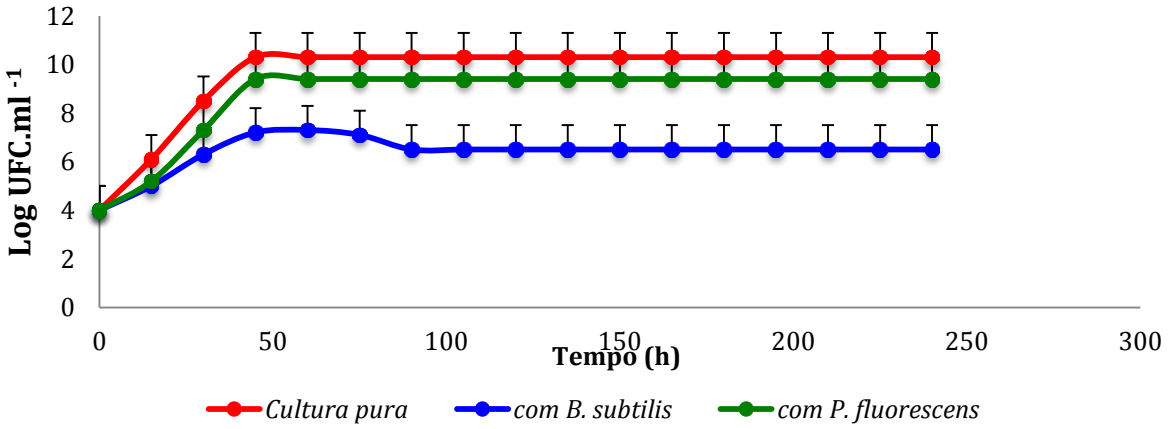


Figura 18 - Curvas de crescimento de ***P. edaphicus*** em cultura pura e cultivado na presença de *B. subtilis e P. fluorescens.*



As *PGP*s adicionadas ao meio de cultura interferiram no crescimento do *E. fredii*, como avaliado pelo título máximo da cultura e manutenção da viabilidade celular na fase estacionária. Assim como observado nas culturas contendo *B. japonicum* e *B. elkanii* (figuras 10 e 11), a adição de *B. subtilis* foi a que mostrou maior efeito inibitório do crescimento do *E. fredii* seja pelo título máximo da cultura seja pela redução na viabilidade da cultura na fase estacionária.

A figura 13 mostra que as culturas de *P. fluorescens* na presença de *B. japonicum, B elkanii e E. fredii,* alcançaram concentrações máximas semelhantes à cultura pura (2 x 10^9 cél/ml) mantendo-se em fase estacionária.

A inoculação de células de *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii* no meio de cultura não apresentaram influencia no crescimento de *B. subtilis* (figura 14) que apresentou fase estacionária com o título da cultura em torno de 2 x 10^8 cél/ml, o mesmo foi observado quando adicionadas as bactérias simbióticas na cultura de *P. edaphicus*, que apresentou fase estacionária de 8 x 10^9 cél/ml (figura 15).

Quando foram realizadas combinações entre as *PGP*s, observou-se que a adição de *P. edaphicus* e *B. subtilis* resultou em menor crescimento da *P. fluorescens* medido tanto pelo título máximo da cultura como pela viabilidade até a fase estacionária (figura 16).

P. edaphicus apresentou menor crescimento quando cultivado com as células de *B. subtilis*, mantendo a fase estacionária com 5 x 10^6 cél/ml (figura 18), com *P. fluores*cens, observou-se um crescimento do *P. edaphicus* ao redor de 4 x 10^9 cél/m, enquanto em cultura pura alcançou 1,2 x 10^{10} cél/ml.

A bactéria *B. subtilis* foi causou a maior inibição no crescimento dos outros microrganimos, porém foi a menos afetada, tanto na presença das simbióticas (figura 14) quanto das outras *PGP*s (figura 17), apresentando uma fase estacionária com o título da cultura de 1,2 x 10^8 cél/ml, quando em cultura pura e adição de células de *P. edaphicus*.

Como foi verificada incompatibilidade entre a bactéria *B. subtilis* e as três simbióticas (*B. japonicum, B. elkanii e E. fredii*), esse microrganismo não foi utilizado nos ensaios *in vivo*, no qual as bactérias foram inoculadas nas sementes de soja para verificar seu efeito no desenvolvimento da planta e nodulação.

5.1.2 Seleção bacteriana dos inoculantes mistos (in vivo)

As bactérias *PGPs* (*P. fluorescens* e *P. edaphicus*) selecionadas no ensaio *in vitro* foram combinadas às simbióticas e aplicadas na soja. O ensaio teve o objetivo de selecionar uma co-inoculação que melhore o desenvolvimento da planta.

Tabela 21. Avaliação da nodulação : (NN) número de nódulos por planta, (MSN) massa seca dos nódulo (mg/planta), (MSPA) massa seca da parte aérea (g/planta), (AP) altura das plantas (cm) e (CR) comprimento da raíz (cm), no florescimento.

	Tratamentos	NN	MSN	MSPA	AP	CR
1	Controle 1- Sem inoculação , sem nitrogênio.	0 N	0 L	4,2 G	9,2 H	19,2 I
2	Controle 2 - Sem inoculação, com amônia.	0 N	0 L	9,1 E	17,4 F	43,3 FG
3	*B. japonicum* SEMIA 5080	32,2 J	133,2 H	9,5 E	18,2 DE	44,3 E
4	*B. elkani* SEMIA 5019	34,7 G	134,6 G	9,2 E	17,6 EF	43,9 EF
5	*E. fredii* SMH12	37,6 D	135,1 F	10,3 D	20,9 C	47,2 C
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *P. edaphicus* VKPM B 7517	27,3 L	123,4 I	7,9 F	14,6 G	39,8 H
7	*B. elkani* SEMIA 5019 + *P. edaphicus* VKPM B 7517	22,3 M	98,4 J	7,8 F	14,9 G	39,9 H
8	*E. fredii* SMH12+ *P. edaphicus* VKPM B 7517	43,7 C	181,6 C	11,2 C	22,7 B	49,3 B
9	*B. japonicum* SEMIA 5080+ *P. fluorescens* ATCC 17552	36,2 E	138,2 D	9,3 E	18,3 DE	45,4 D
10	*B. elkani* SEMIA 5019+ *P. fluorescens* ATCC 17552	35,2 F	132,7 H	9,4 E	17,9 DEF	43,2 G
11	*E. fredii* SMH12+ *P. fluorescens* ATCC 17552	44,8 B	186,2 B	11,9 E	22,9 B	49,9 B
12	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *P. edaphicus* VKPM B 7517+ *P. fluorescens* ATCC 17552	32,6 I	136,2 E	9,3 E	18,4 D	44,2 E
13	*B. elkani* SEMIA 5019 + *P. edaphicus* VKPM B 7517+ *P. fluorescens* ATCC 17552	33,2H	138,2 D	9,4 E	18,2 DE	43,8 EFG
14	*E. fredii* SMH12 + *P. edaphicus* VKPM B 7517 + *P. fluorescens* ATCC 17552	**59,4 A**	**245,3 A**	**13,6 A**	**27,3 A**	**58,9 A**
	Desvio Médio Absoluto	10,8	41	1,36	2,87	4,7
	Desvio Padrão	15,3	62,2	2,1	4,1	8,3
	Coeficiente de Variação (%)	48,7	49,2	22,3	22,6	19,1
	Ponto médio	29,9	122,6	9	18,3	39,5
	Diferença mínima significativa (DMS)	0,23	0,44	0,69	0,74	0,66
	Normalidade 5% (Shapiro-Wilk)	0,86	0,83	0,91	0,92	0,78

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

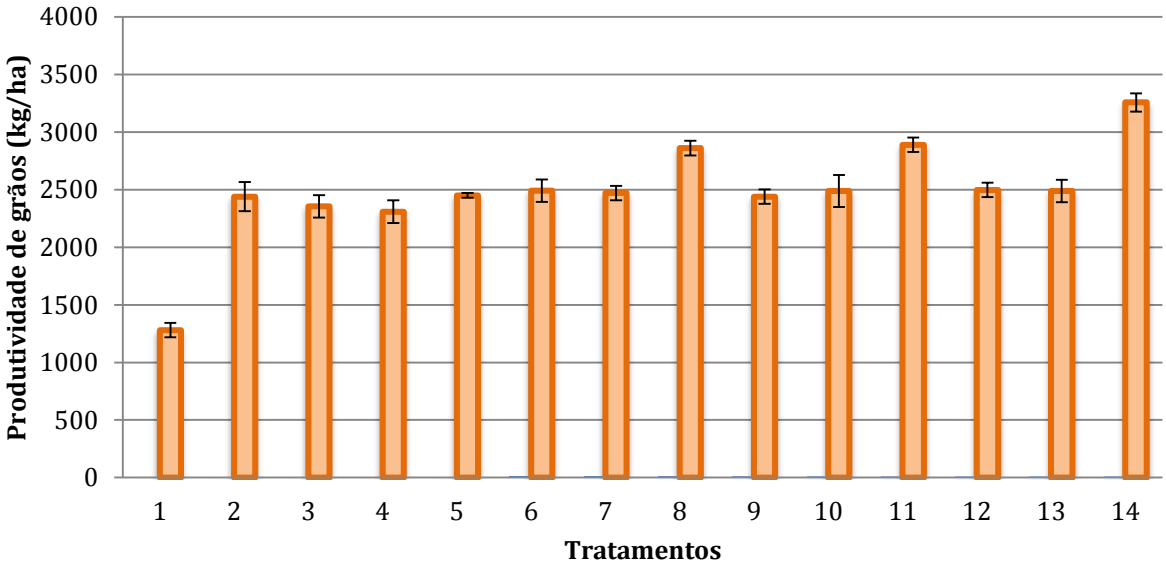
Analisando o número de nódulos por planta de soja (tabela 21), nota-se que as testemunhas não apresentaram nódulos, uma vez que o ensaio foi realizado em condições axênicas (vasos de Leonard). Nos demais tratamentos foram observados nódulos, sendo os maiores naqueles em que as *PGPs* foram combinadas ao *E. fredii* (tratamentos 8, 11 e 14). O número de nódulos e a massa seca dos nódulos do tratamento 14 (*E. fredii + P. edaphicus + P. fluorescens*) foram 84% maiores que aqueles

apenas com *B. japonicum* e *B.elkanii* utilizados comumente como inoculantes comerciais.

Quando analisadas as variáveis massa seca da parte aérea (figura 14), altura da plantas (figura 15) e comprimento da raiz (figura 16) no florescimento, constatou-se os maiores valores nos três parâmetros no tratamento 14 (*E. fredii + P. edaphicus + P. fluorescens*). A testemunha com amônia e os tratamentos 3 (*B. japonicum*), 4 (*B. elkanii*), 9 (*B. japonicum + P. fluorescens*), 10 (*B. elkanii + P. fluorescens*), 12 (*B. japonicum + P. edaphicus + P. fluorescens*) e 13 (*B. elkanii + P edaphicus + P fluorescens*) não diferiram estatisticamente. Os menores valores foram encontrados na testemunha sem adubação, seguida dos tratamentos 6 (*B. japonicum + P. edaphicus*) e 7 (*B. elkanii + P. edaphicus*) que não diferiram estatisticamente entre si.

Na figura 17 são apresentados os valores médios de produtividade de grãos. O tratamento que apresentou maior produtividade foi o 14 (*E. fredii + P. edaphicus + P. fluorescens)* com 3.256 kg/ha, enquanto o que fez uso de adubação nitrogenada (testemunha 2) resultou em rendimento de 2.438 kg/ha, valor que não diferiu estatisticamente dos tratamentos 3 (*B. japonicum)*, 5 (*E. fredii)* , 6 (*B. japonicum + P. edaphicus)*, 7 (*B. elkanii + P. edaphicus)*, 9 (*B. japonicum + P. fluorescens)*, 10 (*B. elkanii + P. fluorescens)*, 12 (*B. japonicum + P. edaphicus + P. fluorescens)* e 13 (*B. elkanii + P. edaphicus + P. fluorescens)* . Os tratamentos 8 e 11 apresentaram valores elevados também empregando inoculação de *E. fredii*.

Figura 19 - Produtividade de grãos (kg/ha).



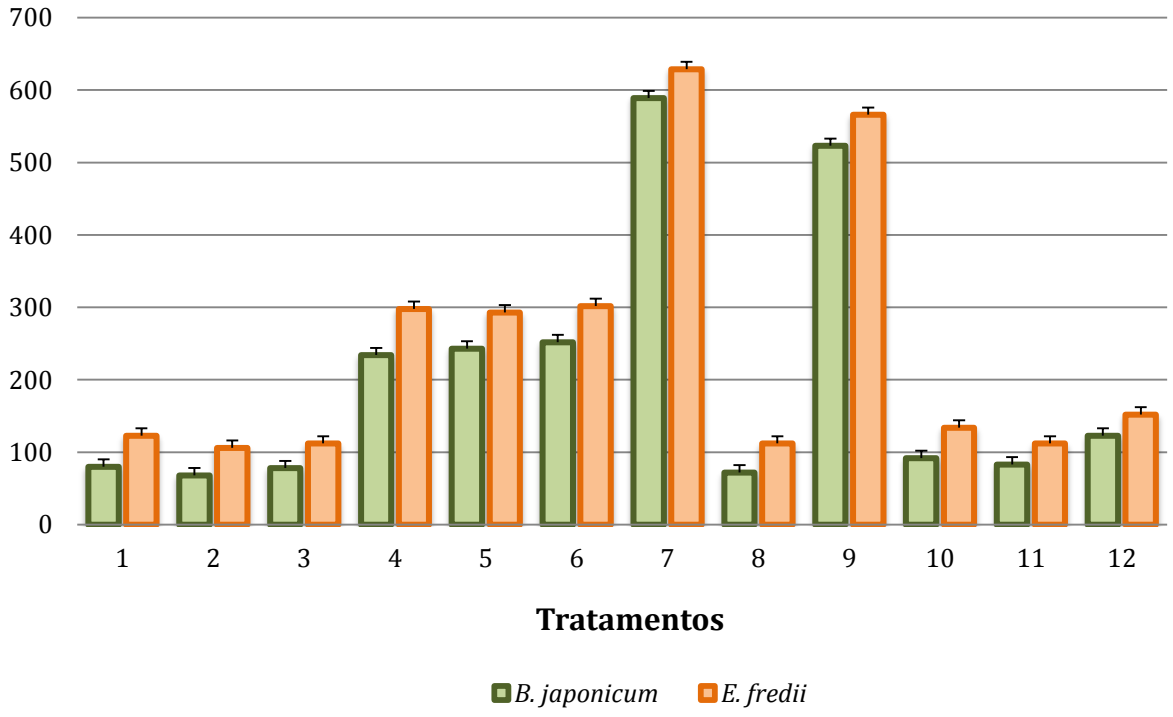
5.2 Fatores Nod

5.2.1 Produção e quantificação de fatores Nod

Na segunda parte do presente trabalho, como nova tecnologia aplicada ao inoculante foram produzidos fatores Nod pelas bactérias simbióticas (*B. japonicum* e *E. fredii*). Os fatores Nod presentes no inoculante fazem parte do pacote biotecnológico para aplicação em sementes de soja.

Foram utilizados oito diferentes tratamentos que utilizaram combinações de seis substâncias (genisteína, daidzeína, isoflavonas de soja, ácidos jasmônico, metil jasmonato e ácido acetilsalicílico) para induzir a produção dos fatores Nod pelos rizóbios. A figura 18, mostra as diferentes concentrações de fatores Nod produzidos por *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *e Ensifer fredii* SMH 12, após indução com as 6 diferentes substâncias.

Figura 20 – Concentração de fatores nod (µg/ml) produzidos por *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 e *E. fredii* SMH12 induzidos por diferentes substâncias.



(1) genisteína, (2) daidzeína, (3) isoflavonas de soja, (4) Genisteína + ácido jasmônico, (5) Daidzeína + ácido jasmônico, (6) Isoflavonas de soja + ácido jasmônico, (7) Genisteína + metil jasmonato, (8) Daidzeína + metil jasmonato, (9) Isoflavonas de soja + metil jasmonato, (10) Genisteína + ácido acetilsalicílico, (11) Daidzeína + ácido acetilsalicílico e (12) Isoflavonas de soja + ácido acetilsalicílico.

As substâncias que induziram maior produção de fatores Nod em *B. japonicum* e *E. fredii* foram genisteína + metil jasmonato (7) com produção, respectivamente de 589 e 629 µg/ml e Isoflavonas de soja + metil jasmonato (9), com a produção de 523 e 566 µg de fatores Nod.ml-1. Em seguida, os maiores valores foram os tratamentos (4) genisteína + ácido jasmônico (234 e 298 µg/ml), (5) daidzeína + ácido jasmônico (243 e 293 µg/ml), (6) isoflavonas de soja + ácido jasmônico (252 e 302 µg/ml), os quais não diferem estatisticamente. Os tratamentos 1 (genisteína), 2 (daidzeína), 3 (isoflavonas de soja), 8 (daidzeína + metil jasmonato), 10 (genisteína + ácido acetilsalicílico), 11 (daidzeína + ácido acetilsalicílico) e 12 (isoflavonas de soja + ácido acetilsalicílico) apresentaram as menores produções de fatores Nod tanto em *B. japonicum* SEMIA 5080, quanto em *E. fredii* SMH 12.

5.2.2 Avaliação do desenvolvimento de plântulas de soja submetidas à aplicação de fatores Nod em câmara de germinação.

As sementes apresentaram a incidência de 3% de *Fusarium sp,* 5% de *Penicillium sp* e 4% de *Aspergillus*. As emergências foram observadas aos quatro dias em 90% das sementes e acima de 97% após o sétimo dia após a semeadura.

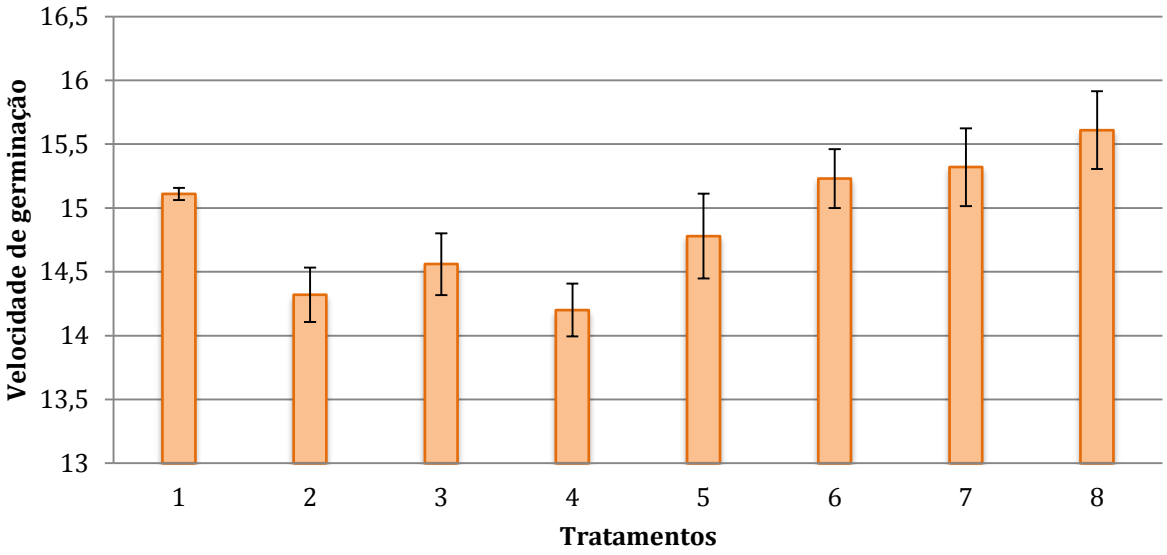
Tabela 22. Emergência das sementes aos 4 e 7 dias.

	Tratamentos	4 dias (%)	7 dias (%)
1	Sem inoculação /sem fertilizante nitrogenado	90,6 AB	97,5a
2	Aplicação de amônia/sem inoculação	90,5 ABC	97,8a
3	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079	90,4 ABC	98,1a
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587	90,4 ABC	97,8a
5	*B. japonicum* SEMIA 5080	90,2 C	97,3a
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores NOD	90,7 A	97,8a
7	*E. fredii SMH12*	90,3 BC	97,3 CD
8	*E. fredii SMH12* + Fatores NOD	90,5 ABC	97,1 D
	Desvio Médio Absoluto	0,14	0,29
	Desvio Padrão	0,18	0,32
	Coeficiente de Variação (%)	0,2	0,33
	Ponto médio	90,4	97,6
	Diferença mínima significativa (DMS)	0,33	0,28
	Normalidade 5% (Shapiro-Wilk)	0,97	0,96

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados do teste de germinação estão apresentados na tabela 22. As contagens do número de sementes germinadas aos 4 e 7 dias apresentaram resultados semelhantes e germinação acima dos 90%. A presença dos fatores Nod não influenciou a germinação das sementes de soja.

Figura 21 - Valores médios da velocidade de germinação .



A maior velocidade de germinação (figura 21) foi observada no tratamentos 8 (*E. fredii* SMH12 + fatores Nod), seguido da testemunha 1 (sem adubação e inoculante) e tratamentos 6 (*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores NOD) e 7 (*E. fredii SMH12*), que não apresentaram diferenças estatísticas. A testemunha 2 (aplicação de amônia/sem inoculação) e tratamento 4 (*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587) foram os que apresentaram menores valores médios.

O tratamento que apresentou maiores valores dos parâmetros comprimento da raiz e parte aérea foi o tratamento 8 (*E. fredii SMH12* + Fatores NOD) e o menor valor foi observado na testemunha sem inoculação e sem adubação nitrogenada. Os outros tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (tabela 23).

Tabela 23. Comprimento da raiz (cm) e parte aérea (cm) das plântulas nos 8 tratamentos.

	Tratamentos	Comprimento raiz (cm)	Comprimento parte aérea (cm)
1	Sem inoculação /sem fertilizante nitrogenado	10,1 D	4,3 C
2	Aplicação de amônia/sem inoculação	11,2 BC	4,2 C
3	*B. japonicum* SEMIA 5080 + SEMIA 5079	11,6 B	4,3 C
4	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 587	10,8 C	4,2 C
5	*B. japonicum* SEMIA 5080	11,2 BC	4,8 B
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores NOD	11,4 B	5,0 B
7	*E. fredii SMH12*	11,3 BC	5,1 B
8	*E. fredii SMH12* + Fatores NOD	15,9 A	7,2 A
	Desvio Médio Absoluto	1,05	0,66
	Desvio Padrão	1,65	0,94
	Coeficiente de Variação (%)	14,12	19,26
	Ponto médio	13	5,7
	Diferença mínima significativa (DMS)	0,47	0,33
	Normalidade 5% (Shapiro-Wilk)	0,64	0,72

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

5.2.3 Avaliação do desenvolvimento de soja com fatores Nod

A figura 22 mostra que o maior rendimento dos grãos de soja foi observado no tratamento 7 (*E. fredii* SMH12 + Fatores Nod) com produção de 3.821 kg/ha, seguido do tratamento 6 (*B. japonicum* + Fatores Nod) com 3.775 kg/ha, enquanto os tratamentos com culturas puras de rizóbios (3, 4 e 5) e a testemunha com adubação nitrogenada não diferiram estatisticamente entre si.

Figura 22 – Rendimento dos grãos de soja (kg/ha).

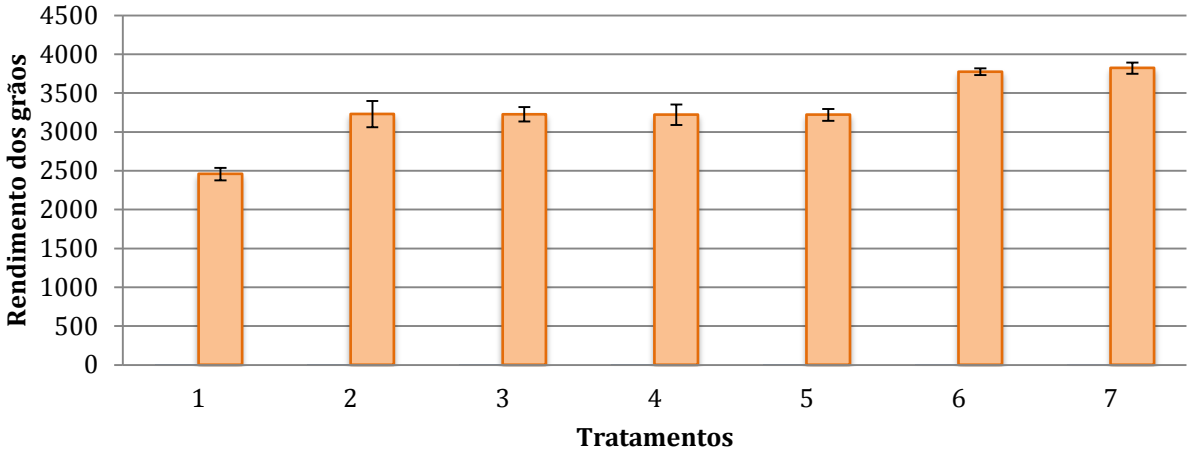


Tabela 24. (NG/V) Número de grãos / número de grãos por vagem (unidade), (MG) massa dos grãos (g) e (IC) índice de colheita (%).

	Tratamentos	NG/V	MG	MG
1	Sem inoculação , sem nitrogênio.	1,54 F	85 E	37 C
2	Sem inoculação, com amônia.	2,24 E	123 C	39 BC
3	*B. japonicum* SEMIA 5080	2,34 C	120 D	40 BC
4	*B. elkanii* SEMIA 5019	2,26 E	123 C	42 B
5	*E. fredii* SMH 12	2,31 D	119 D	41 B
6	*B. japonicum* SEMIA 5080+ Fatores Nod	2,83 B	141 B	57 A
7	*E. fredii* SMH12 + Fatores Nod	2,93 A	144 A	58 A
	Média	2,35	121,8	44,8
	Desvio Médio	0,39	16,70	7,22
	CV(%)	16,59	13,71	18,70
	Ponto médio	2,23	114,5	47,5
	DMS	0,03	2,78	3,33
	Shapiro-Wilk	0,85	0,82	0,76

Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

A tabela 24 mostra que os tratamentos 6 (Inoculação com *B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores Nod) e 7 (*E. fredii* SMH12 + Fatores Nod) apresentaram os maiores valores em relação ao número de grãos por vagem e massa dos grãos, em comparação à média dos tratamentos contendo somente o inoculante (3, 4 e 5).

5.3 Vitamina B12/cobamamida

5.3.1 Produção e quantificação de vitamina B12

Na terceira parte do estudo foi avaliado o efeito da aplicação de vitamina B12 e cobamamida na nodulação da soja, esta tecnologia aplicada ao inoculante faz parte do desenvolvimento do pacote biotecnológico. Em laboratório a bactéria simbiótica *B. japonicum* produziu 0,7 μg/ml de vitamina B12, enquanto *E. fredii* produziu 1,9 μg/ml.

5.3.2 Avaliação da aplicação de cobamamida e vitamina B12 na nodulação de soja

A tabela 25 mostra o número de nódulos e massa seca dos nódulos dos 18 tratamentos aplicados à semente de soja. A vitamina B12 produzida por *B. japonicum e E. fredii,* quando aplicados nas sementes de soja, não resultaram em diferenças estatisticamente significativas em relação à inoculação apenas da bactéria. A aplicação de suplementação de cobamamida e vitamina B12 nas concentrações de 1; 1,5 e 2 mg/ml, junto ao *B. japonicum* ou *E. fredii,* aumentaram a nodulação em relação a inoculação apenas da bactéria, porém não diferiram estatisticamente entre si, tanto no número de nódulos, quanto na massa seca dos nódulos.

O mesmo perfil foi obtido em relação à matéria seca da parte aérea (figura 23), os tratamentos com *E. fredii* e suplementação com vitamina B12 e cobamamida, 13 (*E. fredii +* vitamina B12, 1 mg/ml), 14 (*E. fredii +* cobamamida, 1 mg/ml), 15 (*E. fredii +* vitamina B12, 1,5 mg/ml), 16 (*E. fredii +* cobamamida, 1,5 mg/ml), 17 (*E. fredii +* vitamina B12, 2 mg/ml) e 18 *E. fredii +* cobamamida 2 mg/ml) apresentaram os maiores valores, não diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 25. Avaliação do número de nódulos (NN) e peso dos nódulos (PN) após 45 dias da semeadura.

Trat	Descrição	NN	PN
1	Sem inoculação e sem nitrogênio	0 N	0 O
2	Sem inoculação e com amônia	0 N	0 O
3	*B. japonicum* SEMIA 5080	34,3 M	132,3 N
4	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 produzida pela bactéria (0,7 μg/ml)	35,3 L	134,5 M
5	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (1 mg/ml)	43,9 H	181,2 I
6	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (1 mg/ml)	44,3 G	182H
7	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (1,5 mg/ml)	44,8 F	183,2F
8	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (1,5 mg/ml)	44,4 G	182,4 H
9	*B. japonicum* SEMIA 5080+ vitamina B12 (2 mg/ml)	44,3 G	181,9 H
10	*B. japonicum* SEMIA 5080+ cobamamida (2 mg/ml)	44,6 FG	182,8 G
11	*E. fredii* SMH12	38,2 J	138,2 L
12	*E. fredii* + vitamina B12 produzida pela bactéria (1,9 μg/ml)	39,2 I	144,2 J
13	*E. fredii* SMH12+ vitamina B12 (1 mg/ml)	52,7 B	203,4 E
14	*E. fredii* SMH12+ cobamamida (1 mg/ml)	**53,2 A**	**207,3 A**
15	*E. fredii* SMH12+ vitamina B12 (1,5 mg/ml)	51,4 E	206,4 B
16	*E. fredii* SMH12+ cobamamida (1,5 mg/ml)	52,3 CD	203,8 D
17	*E. fredii* SMH12+ vitamina B12 (2 mg/ml)	52,6 BC	205,3 C
18	*E. fredii* SMH12+ cobamamida (2 mg/ml)	52,2 D	207,3 A
	Média	40,42	159,7
	Desvio Médio	10,61	45,48
	CV(%)	38,5	38,6
	Ponto médio	26,6	103,7
	DMS	0,3	0,29
	Shapiro-Wilk	0,69	0,69

Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Figura 23 - Massa seca da parte aérea (g/planta) nos 18 tratamentos.

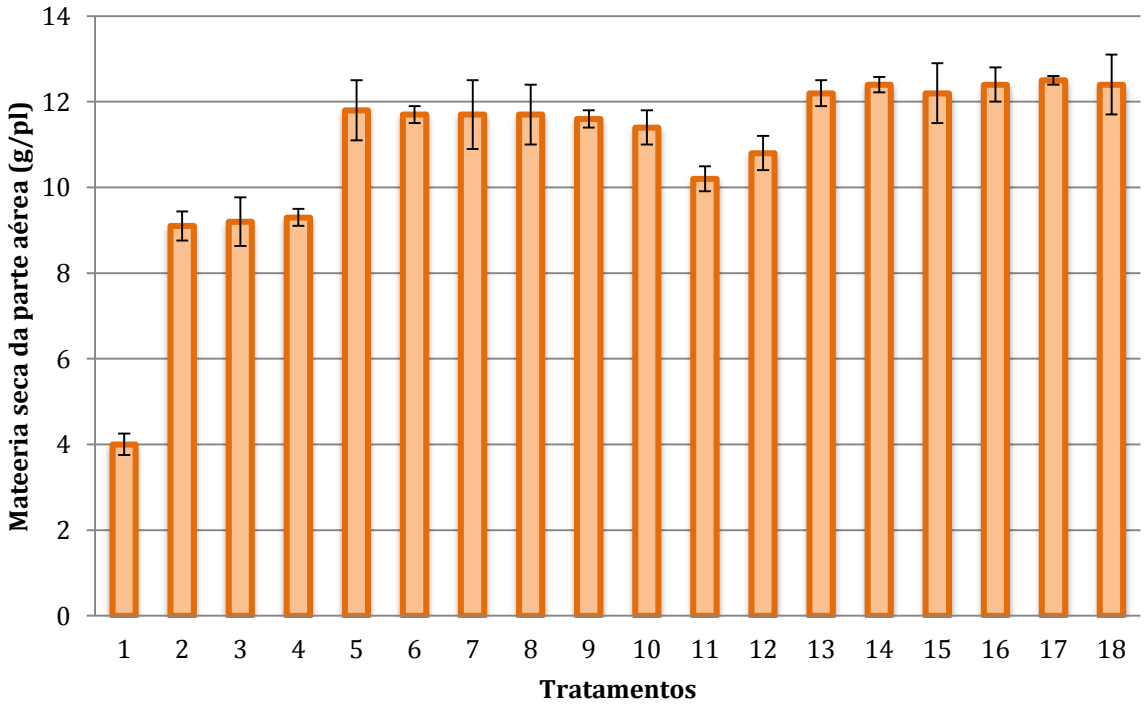


Figura 24 - Visão geral do experimento em casa-de-vegetação para avaliação da nodulação com e sem a adição de cobamamida e vitamina B12.

5.4 Pacote biotecnológico

5.4.1 Avaliação do pacote biotecnológico no rendimento da soja em campo

Na última etapa do presente trabalho, os inoculantes mistos e as tecnologias aplicadas aos inoculantes, fatores Nod e cobamamida, foram avaliados em conjunto em campo de cultivo de soja para o desenvolvimento de um pacote biotecnológico.

Analisando a tabela 26 observa-se que a maior altura das plantas de soja foi alcançada quando aplicado o tratamento 16 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod), enquanto o menor resultado foi observado na testemunha sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

Figuras 25 e 26 – Visão geral do experimento em campo de cultivo de soja.

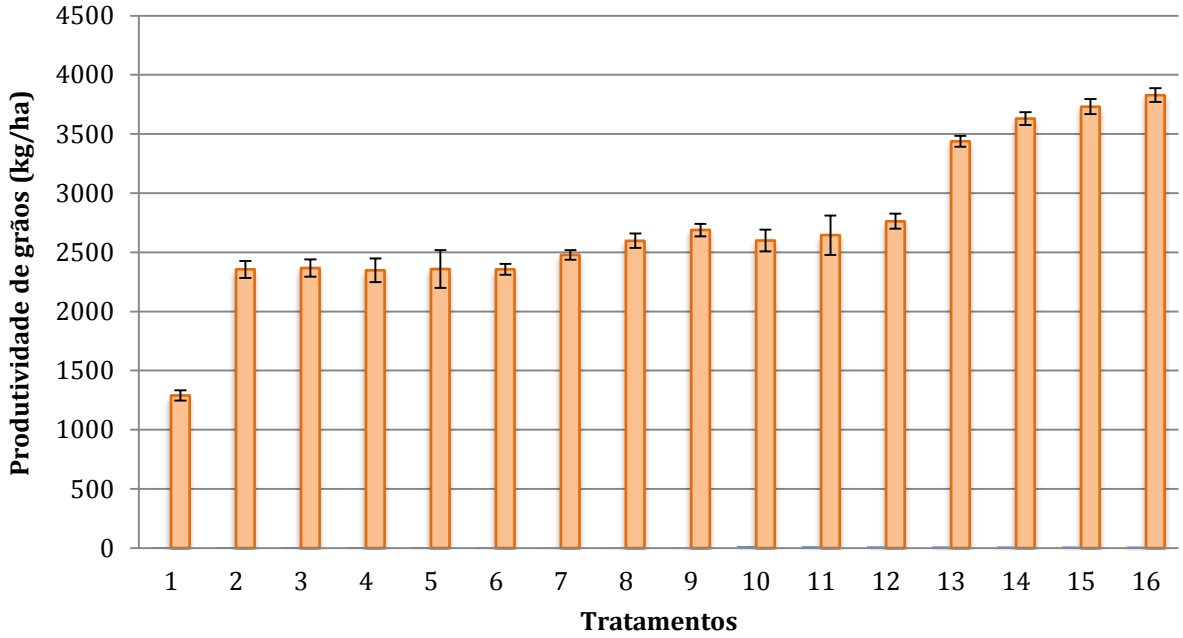
A maior produtividade dos grãos de soja (tabela 26) foi observada no tratamento 16 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod) com 3.829 kg.ha^{-1}, os tratamentos 2,3 4 ,5 e 6 não diferiram estatisticamente. Os tratamentos que apresentaram as maiores produtividades foram os tratamentos 13 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens*) com 3.439 kg.ha^{-1}, 14 (*E. fredii + P. edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida), com 3.630 kg.ha^{-1}, 15 (*E. fredii + P. edaphicus + P. fluorescens* + Fatores Nod), com 3.732 kg.ha^{-1}.

Tabela 26. (ALT) Altura da plantas (m), (APV) altura media da inserção da primeira vagem (cm), (PMV) peso médio de vagens por planta, (CMV) comprimento médio da vagem (cm), (NMVP) número médio de vagens por planta, (NMGV) número médio de grãos por vagem e (PMV) produtividade média de vagens (kg/ha) nos 16 diferentes tratamentos, com 10 repetições.

	Tratamentos	APV	ALT	NMVP	PMV	CMV	NMGV	PV
1	Controle 1- Sem inoculação , sem nitrogênio.	5,38m	1,33j	31,23o	1,88j	13,22o	6,52p	9720p
2	Controle 2 - Sem inoculação, com amônia.	8,08l	2,54i	54,20l	2,31i	17,44l	7,05o	19693l
3	*B. japonicum* SEMIA 5080	8,33i	2,57i	53,20m	2,82d	18,01j	7,13n	20332j
4	*B. elkanii* SEMIA 5019	8,20j	2,57i	52,91n	2,34hi	17,29m	7,15n	19344n
5	*E. fredii* SMH12	8,44h	2,66h	53,22m	2,34hi	17,23m	7,23m	19254o
6	*B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 5019	8,32i	2,59i	52,91n	2,55g	16,33n	7,31l	19388m
7	*B. japonicum* SEMIA 5080 + cobamamida	9,32g	2,66h	54,39j	2,63ef	18,23i	7,42j	22560i
8	*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores Nod	9,44f	2,83f	64,33h	2,38h	19,44h	8,39h	23890h
9	*B. japonicum* SEMIA 5080 + cobamamida + Fatores Nod	10,38d	2,85f	67,92g	2,57fg	21,22f	8,33i	23893h
10	*E. fredii* SMH12+ cobamamida	10,44c	2,76g	62,49i	2,63e	20,12g	8,93g	24362g
11	*E. fredii* SMH12+ Fatores Nod	10,32e	2,93e	73,23f	2,59efg	21,32e	9,29e	25199f
12	*E. fredii* SMH12+ cobamamida + Fatores Nod	10,37d	3,02d	74,39e	2,37h	21,59d	9,23f	25389e
13	*E. fredii + P.edaphicus + P. fluorescens*	11,23b	3,32c	89,32d	2,63e	22,56c	11,23d	30291d
14	*E. fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida	11,39a	3,42b	89,54c	2,93c	21,37e	11,34c	31090b
15	*E. fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + Fatores Nod	11,34a	3,46b	92,39b	3,44b	24,32b	12,23b	31029c
16	*E. fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod	11,23b	3,59a	109,21a	4,23a	26,53a	12,88a	32489a
	Média	9,5	2,82	67,17	2,66	19,76	8,85	23619
	Desvio Médio	18,21	0,35	15,71	0,34	2,61	1,64	438,32
	CV(%)	17	18,4	29,1	19,8	16,37	22,56	24,42
	Ponto médio	8,38	2,46	70,22	3,05	19,87	9,7	21104,5
	DMS	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	5,39
	Shapiro-Wilk	0,88	0,85	0,91	0,80	0,96	0,86	0,91

Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Figura 27 - Produtividade de grãos (kg/ha).



Os maiores valores na altura media de inserção da primeira vagem (tabela 26) foram verificadas nos tratamentos 13 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens*), 14 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida), 15 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + Fatores Nod) e 16 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod), que não diferiram estatisticamente entre si. O maior peso médio de vagens por planta e comprimento médio da vagem (tabela 26) foram encontrados no tratamento 16 (*E. fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod).

A maior produtividade de vagens (tabela 26) foi verificada no tratamento 16 (32.489 kg.ha^{-1}). Os tratamentos 13 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens*), 14 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida) e 15 (*E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + Fatores Nod) não diferiram estatisticamente entre si. O mesmo foi observado entre os tratamentos 7*(B. japonicum* SEMIA 5080 + cobamamida), 8 (*B. japonicum* SEMIA 5080 + Fatores Nod), 9 (*B. japonicum* SEMIA 5080 + cobamamida + Fatores Nod), 10 (*E. fredii* + cobamamida), 11 (*E. fredii* SMH12+ Fatores Nod) e 12 (*E. fredii* SMH12+ cobamamida + Fatores Nod), que apresentaram uma produtividade média de 23.676 kg.ha^{-1}.

Na avaliação dos parâmetros, número médio de vagens por planta e número médio de grãos por vagens (tabela 26), os maiores valores foram alcançados com a aplicação de *E.fredii + P.edaphicus + P. fluorescens* + cobamamida + Fatores Nod .

6 DISCUSSÃO

6.1 Inoculantes agrícolas mistos

Um dos impactos causados pela conversão de áreas de vegetação nativa em sistemas de produção é a redução da biodiversidade. A inoculação de microrganismos, com diferentes papéis no ecossistema, pode restaurar a variedade biológica do solo, permitindo a manutenção de sua capacidade produtiva ao longo do tempo (MPEPEREKI et al., 2000).

A primeira etapa do desenvolvimento dos inoculantes mistos para aplicação em sementes de soja, foi o estudo da interação dos rizóbios (*B. japonicum*, *B. elkanii e E. fredii*) com as *PGP*s (*P. fluorescens*, *P. edaphicus e B. subtilis) in vitro*.

Quando adicionadas células de *P. fluorescens* e *P. edaphicus* no meio de cultura contendo *B. japonicum, B. elkanii e E. fredii*, (figuras 10, 11 e 12), observou-se uma queda no título da cultura na fase estacionária, porém a população dos rizóbios continuou elevada, indicando a possibilidade de desenvolver inoculantes mistos contendo essas duas bactérias associativas em combinações com as simbióticas.

No caso da presença de *B. subtilis* verificou-se que esta bactéria inibiu o crescimento dos rizóbios e todas as células bacterianas foram eliminadas, desta forma o ensaio *in vitro* demonstrou que essa *PGP* pode colocar em risco o sucesso da inoculação das bactérias simbióticas em soja. Em *B. japonicum* e *B. elkanii* a população iniciou acentuada queda após 180 h chegando à completa mortalidade após 540 h de cultivo. Estes dados podem indicar que os metabólitos secundários produzidos pelo *B. subtilis* resultaram em efeitos inibitórios no crescimento dos rizóbios. A adição de células de *B. subtilis* aos meios contendo *P. edaphicus* (figura 15) e *P. fluorescens* (figura 16) também causaram quedas no título das fases estacionárias, porém não houve mortalidade bacteriana total. Uma co-inoculação com as três PGP em soja seria possível, porém como existe a necessidade de uma simbiótica como parte do pacote biotecnológico retirou-se o *B. subtilis* dos testes *in vivo.*

No ensaio *in vivo*, os rizóbios e *PGP*s foram adicionadas em culturas puras, combinadas entre si (tabela 21) e aplicadas às sementes de soja para avaliar a nodulação, desenvolvimento e produtividade das plantas de soja. A adição dos rizóbios aos meios contendo as bactérias *PGP*s (figuras 13, 14 e 15) não influenciou nas curvas de

crescimento, mantendo-se os mesmos títulos das culturas na fase estacionária que as encontradas nas culturas puras. Quando introduzidas via sementes, co-inoculação de *PGP*s com *B. japonicum* e *B. elkanii* não resultou em aumento da nodulação (tabela 21).

Em relação ao *E. fredii*, observou-se que a co-inoculação dessa bactéria com *P. fluorescens* resultou em aumento no número de nódulos na ordem de 19%, e quando combinadas ao *P. edaphicus* houve aumento de 16%. Quando co-inoculadas as três bactérias (*E. fredii*, *P edaphicus* e *P. fluorescens*), o aumento foi de 58% em relação à inoculação da cultura pura contendo apenas *E. fredii*, o que indica um sinergismo entre essas duas *PGP*s e o rizóbio. Os parâmetros avaliados: massa seca da parte aérea, altura das plantas e comprimento da raiz (tabela 21), coletados no florescimento do soja, indicaram que a co-inoculação de *E. fredii, P. edaphicus* e *P. fluorescens* foi a que apresentou maiores valores.

Na avaliação da produtividade de grãos verificou-se que a aplicação da combinação contendo as três bactérias *E. fredii, P. edaphicus* e *P. fluorescens,* foi 33 % maior que os tratamentos somente com *B. japonicum* e *B. elkanii,* bactérias encontradas nas formulações comerciais atualmente.

No presente trabalho a co-inoculação dos rizóbios com *B. subtilis* tornou-se inviável uma vez que os metabólitos inibiram seus crescimento, porém ensaios realizados por Li e Alexander (1988), nos quais foram co-inoculados *Bacillus* sp. com mutantes de *B. japonicum* resistentes aos seus metabólitos, foi observado significativo aumento na nodulação da soja. Segundo Besson et al. (1990) e Phae e Shoda (1991), o modo de ação e síntese dos metabólitos produzidos por *B. subtilis in vitro* e *in vivo* são diferentes devido à disponibilidade dos nutrientes no meio de cultura e no solo, desta forma os metabólitos antagônicos aos rizóbios, como observado nas figuras 10, 11 e 12, não ocorreriam *in vivo*. Araújo et al. (2010) também verificaram aumentos na matéria seca da raiz em feijão-caupi co-inoculado com *B. japonicum e B. subtilis.*

A co-inoculação dos rizóbios *B. japonicum* e *B. elkanii* com as *PGP*s não resultou em melhoras no desenvolvimento da soja, concordando com Bárbaro et al. (2011) que observaram que a co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* não influenciou a nodulação, massa seca da parte aérea e radicular de soja.

Outros trabalhos como de Rodrigues et al. (2015) verificaram aumento na matéria seca da raiz quando co-inocularam as plantas de feijão-caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus*. Diversos relatos demonstram efeitos positivos de

rizóbios co-inoculados com outras bactérias *PGP*s (SILVA et al., 2007; STAMFORD et al., 2003), pela produção de hormônios vegetais, pectinase ou sinais moleculares. Silva et al. (2006) observaram que *Bradyrhizobium* co-inoculado com *Paenibacillus polymyxa* e *P. macerans* estimularam a nodulação em feijão-caupi, com aumento na absorção de cálcio, ferro e fósforo. Em soja foram verificados efeitos positivos utilizando-se bactérias das espécies *Bacillus cereus* (HALVERSON et al, 1993), *Agrobacterium* spp. (SCHMIDT et al., 2015), *Azospirillum* spp. (ANDREEVA et al., 1991) *Pseudomonas fluorescens e Glomus mossea* (SHABAYEV et al. 1995).

No ensaio *in vivo* observou-se que a co-inoculação com a bactéria *P. fluorescens* e *E. fredii* apresentou 19% mais nódulos e aumento em 37% na massa seca dos nódulos quando comparado ao tratamento apenas com *E. fredii*. A presença de *P. fluorescens* aumentou a massa seca da parte aérea em 29%, a altura das plantas em 30% e o comprimento da raiz em 13,6%, assim como maior produtividade de grãos, com 25% mais sementes produzidas quando adicionado *P. fluorescens,* ao compararmos à inoculação da cultura pura de *E. fredii*.

As *P. fluorescens* produzem enzimas fosfatases e ácidos orgânicos que solubilizam fosfato do solo, aumentando a disponibilidade de fósforo para a planta. O fósforo depois do nitrogênio é o nutriente inorgânico requerido em maior quantidade pelas plantas e microrganismos. Mesmo abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica, o fosfato não pode ser absorvido pelas plantas, sendo necessária a solubilização por microrganismos para a sua incorporação (ALEXANDER, 1980). A deficiência de fósforo limita a fixação biológica do nitrogênio, principalmente em solos ácidos. O efeito da nutrição de fósforo na FBN é muito importante, pois o aumento de sua disponibilidade incrementa a nodulação, metabolismo e crescimento vegetal (ANDREW; ROBINS, 1969; CASSMAN et al., 1981, GATES, 1987; SINGLETON et al. 1985).

Stein (1988) relatou que *P. fluorescens*, utilizada no tratamento de sementes de tomate, promoveu aumentos de germinação e peso fresco de até 60,3 e 78%, respectivamente. Mantovanello e Mello (1994) obtiveram aumentos no peso da parte aérea (até 44%) e raízes (36,8%), em solo não autoclavado, já em solo autoclavado os aumentos foram respectivamente de até 138,5 e 119%.

De acordo com Staudt et al. (2012), *Pseudomonas fluorescens* aplicadas em plântulas de feijão juntamente com micorrizas e *Rhizobium tropici* promoveram aumentos de peso seco de caules e nódulos e conteúdo de fósforo e nitrogênio. Cattelan

(1993) bacterizou sementes de soja com suspensões de *Pseudomonas e* observou aumentos no comprimento das raízes das plântulas de 76%, o que foi atribuído a produção de promotores de crescimento.

Diferentes trabalhos comprovam que vários isolados de *P. fluorescens* produzem antibióticos inibidores de inúmeros patógenos. Brisbane et al (1989) relatam a inibição de dezessete fungos patógenos por um isolado de *P. fluorescens.* Utilizando o mesmo isolado, Bakker et al. (1991) conseguiram o controle de *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, causador da doença mal-do-pé em trigo.

Em *P. fluorescens* notamos a presença de sideróforos, substâncias quelantes do íon férrico, produzidas por microrganismos em deficiência de ferro (LEONG, 1986). Os organismos produtores de sideróforos tem vantagem sobre os outros, pois possuem um processo específico para retirada do nutriente da molécula quelante e seu transporte para o interior da célula (HOHNADEL; MEYER, 1988). Em *P. fluorescens,* o que lhes confere fluorescência é justamente um sideróforo (pioverdina) (STANIER et al., 1966; MEYER & ABDALLAH, 1978). Há muito tempo já se comprovou que isolados de *P. fluorescens* podem promover crescimento vegetal por privar de ferro potenciais fitopatógenos (KLOEPPER et al., 1980).

Outro aspecto importante são os patógenos subclínicos, que são os microrganismos que não causam sintomas óbvios de doença, porém deprimem o crescimento da planta como um todo (WOLTZ, 1978). Freitas e Pizzinatto (1997) trabalhando com *P. fluorescens e Bacillus* spp*.,* demonstraram sua capacidade no biocontrole de *Colletotrichum gossypii* (causador de podridões em algodoeiro).

Os sideróforos estão envolvidos no fornecimento de ferro como nutriente para as plantas. Mesmo abundante na crosta terrestre, o ferro nem sempre está em forma disponível às plantas. Em solos neutros o ferro encontra-se na forma oxidada e não é absorvida pelos vegetais (FROEHLICH; FEHR, 1981). As plantas podem ser eficientes ou ineficientes em ferro, apresentando ou não resposta metabólica à falta de ferro (HOPKINS et al., 1992). Morris et al. (1990) sugeriram que microrganismos constituiriam um dos fatores de solo a influenciar o aparecimento de clorose por deficiência de ferro, seja por competição com as plantas pelo nutriente, seja pela mobilização do ferro lábil no solo.

A *Pseudomonas fluorescens* pode ser utilizada como biocontrole, Siddiqui et al. (2005) relataram que um isolado de *Pseudomonas* spp. diminuiu o crescimento,

multiplicação e manifestação do nematóide *Meloidogyne incognita*. Isolados de *Pseudomonas fluorescens* tiveram eficácia comparável à do fungicida carbendazim, recomendado para o controle de *Rhizoctonia solani* em arroz (KAGALE et al., 2004).

Assis et al. (1995) estudaram o potencial de rizobactérias no controle da podridão-negra das crucíferas e antracnose do rabanete causadas por *Xanthomonas campestris* e *Colletrichum gloesporioides,* em condições de campo. *P. fluorescens* reduziu a severidade da doença em 48,1% comparada com 44,8% de controle obtido pelo antibiótico kasugamicina. *P fluorescens* reduziu 60,4% da antracnose em soja.

Outro fator importante é a resistência sistêmica induzida pelas bactérias *PGP*s, na qual a planta desenvolve uma capacidade defensiva contra um largo espectro de patógeno e pragas, após estimulação apropriada (RAMAMOORTHY; SAMIYAPPAN, 2001). Tratamentos de sementes com bactérias promotoras de crescimento resultaram em modificações na estrutura da parede celular e a mudanças bioquímicas e fisiológicas, que levam à síntese de proteínas e substâncias químicas envolvidas em mecanismos de defesa das plantas (PIETERSE; VAN WEES, 2015).

Muitas enzimas vegetais estão envolvidas em reações de defesa contra fitopatógenos, incluindo as enzimas oxidativas, peroxidases e polifenol oxidase que agem catalisando a formação de lignina, contribuindo para a formação de barreiras defensivas (CHEN et al., 2000).

No presente trabalho, a co-inoculação de *P. edaphicus* VKPM B 7517 com *E. fredii* SMH12 apresentou benefícios à planta quando comparado apenas com a inoculação do *E. fredii* e dos outros dois rizóbios, *B. japonicum* SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 5019. Quanto aos parâmetros para avaliação da nodulação, a co-inoculação resultou em 36% mais nódulos e 34,5% de aumento na massa seca dos nódulos (tabela 21). A massa seca da parte aérea foi 23% maior, a altura das plantas 30,4% maior, aumentou em 13,8% o comprimento da raiz , assim como resultou em produtividade 17,3% maior (tabela 21).

Bactérias da estirpe *P. edaphicus* VKPM B 7517 são capazes de solubilizar rochas potássicas pela secreção de ácidos orgânicos (BASAK; BISWAS, 2009) como as micas, do grupo dos filossilicatos, ilitas e ortoclases ($KAlSi_3O_8$) (STYRIAKOVA et al, 2003). O potássio é um macronutriente muito importante na fertilização das plantas, são utilizadas grandes quantidades de fertilizantes químicos para suprir a necessidade nutricional desse elemento.

Em relação ao rendimento, a co-inoculação de *E. fredii* SMH12, *P. edaphicus* VKPM B 7517 e *P. fluorescens* ATCC 17552 quando comparado ao tratamento com culturas puras de rizóbios, resultou em aumento de 41% na produção de grãos de soja (figura 19).

6.2 Fatores Nod

Dentre as seis substâncias utilizadas para indução da síntese de fatores Nod pelas bactérias *B. japonicum* SEMIA 5080 e *E. fredii* SMH12, a adição de genisteína com metil jasmonato, ao meio de cultura, foi a que resultou em maior produção por ambas as espécies, com as concentrações respectivas de 589 e 629 µg/ml. Essas foram as concentrações utilizadas nos ensaios *in vivo*. Pela primeira vez foram descritos ensaios com aplicação de fatores Nod produzidos por *Ensifer fredii* SMH12 em plantas de soja.

Mabood et al. (2006a), demonstraram que o ácido jasmônico, um importante hormônio vegetal encontrado naturalmente em plantas superiores (MEYER et al, 1984) e indutor de resistência à doenças (GUNDLACH et al, 1992), pode induzir a expressão de genes nod em *B. japonicum*, sintetizando os fatores Nod. Resultados experimentais têm mostrado a possibilidade de se obter incrementos no rendimento pelo fornecimento dos fatores Nod. Hungria e Stacey (1997) adicionaram 40 µM de genisteína num inoculante contendo *B. japonicum* e observaram incremento de 20% na produtividade da soja. Mabood et al. (2006b), pré-incubou, durante 24 horas, meio de cultura contendo *B. japonicum* com genisteína e ácido jasmônico (20 µM + 50 µM), e obtiveram aumento de 32% na produção de grãos de soja.

Na avaliação do desenvolvimento de plântulas de soja submetidas à aplicação de inoculantes contendo fatores Nod, observou-se que essa tecnologia não influenciou na emergência das sementes (tabela 22), porém o tratamento com *E. fredii* SMH12 + fatores Nod resultou em maior velocidade de germinação (figura 21), assim como maiores plântulas, com radículas 37% maiores e a parte aérea 71% maior em relação aos tratamentos apenas com rizóbios (tabela 23).

No presente estudo verificou-se que a inoculação de *E. fredii* SMH12 ou *B. japonicum* SEMIA 5080 com fatores Nod resultou em uma produção de grãos de soja 18% superior em comparação aos tratamentos somente com os rizóbios (figura 22),

assim como aumento de 25% no número de grãos por vagem, 17% na massa dos grãos e 45% no índice de colheita.

Os resultados positivos no desenvolvimento da soja nos tratamentos com fatores Nod, segundo Sanjuan et al. (1993), podem ser explicados por algumas características dos fatores Nod, como a indução de diversas modificações nas raízes de soja, na divisão das células do córtex e deformação dos pêlos radiculares. Ainda segundo o autor, a presença dos fatores Nod estimula processos que promovem o crescimento e desenvolvimento antecipado da soja, melhorando a nodulação e aumentando o rendimento dos grãos. Causam uma emergência acelerada da plântula, aumentam as taxas de fotossíntese e de crescimento. Os fatores Nod também induzem resistência à gliceolina, uma fitoalexina, produzida pela soja como bactericida para impedir a entrada de microrganismos na raiz (MORANDI, 1996).

Os fatores Nod são inicialmente percebidos pelas células epidérmicas da zona de diferenciação do pelo radicular. A rápida entrada de Ca2+ e uma despolarização transitória da membrana plasmática, associada ao efluxo de Cl- e K+ para dentro das células, acompanhado da alcalinização do citoplasma do pelo radicular e alguns minutos de oscilação de Ca+2 (EHRHARDT et al., 1996) e subsequente rearranjo dos filamentos de actina e redirecionamento do crescimento da raiz resultam no encurvamento do pelo, com posterior entrada das bactérias (VLASSAK et al., 1997).

Broughton et al. (2003) dicutiram as perspectivas da utilização de sinais químicos entre planta e bactéria na agricultura, chegando-se a conclusão que poderá ser um dos fatores mais importantes e determinantes no aumento da produtividade da soja no mundo.

6.3 Vitamina B12/cobamamida

No presente trabalho avaliou-se o efeito da aplicação de vitamina B12 e sua coenzima, a cobamamida, na nodulação da soja. A vitamina B12 produzida em laboratório por *B. japonicum* SEMIA 5080 (0,7 μg/ml) e *E. fredii* SMH12 (1,9 μg/ml) foram aplicadas nas sementes de soja junto ao inoculante com cada um dos rizóbios que as produziram e observou-se que não houve aumento na nodulação.

Quando aplicadas diferentes doses de vitamina B12 (1; 1,5 e 2 mg/ml) e cobamamida (1; 1,5 e 2 mg/ml) (tabela 25 e figura 23) verificou-se que os efeitos das

seis doses não diferiram estatisticamente entre si, porém resultaram em 24% mais nódulos e aumento de 34% no peso dos nódulos quando comparadas aos tratamentos somente com *B. japonicum*.

O aumento na nodulação pode ser explicado pela importância da vitamina B12 na biossíntese da leg-hemoglobina. A leg-hemoglobina é um pigmento de coloração avermelhada, cuja função é facilitar o transporte de ATP, necessário para a fixação, sem afetar a nitrogenase (muito sensível ao oxigênio) (LANTMANN, 2002). Nos nódulos funcionais, o pigmento pode oxidar-se, determinando o fim do processo. A mudança de coloração de vermelho para marrom-esverdeado é o primeiro sinal visível a olho nu da senescência nodular, que ocorre a partir da região central em nódulos de crescimento determinado, como a soja (WANG et al., 2014). No ensaio foram observados nódulos vermelhos, indicando FBN ativa em todas as plantas coletadas. Quando não há compatibilidade entre a bactéria e a planta, o simbiossomo passa a considerar os bacterióides como patogênicos e agir como um compartimento lítico, desencadeando a degradação dos bacteriódes quando o nódulo senesce, colonizando locais que poderiam ser ocupados por bactérias funcionais, mas não processando a FBN (SPRENT, 2001).

Quando comparados à inoculação da cultura pura de *E. fredii* SMH12 (tabela 25) as seis doses resultaram em aumentos de 39% no número de nódulos e 51% no peso dos nódulos, mas também não diferiram entre as doses.

Atualmente as indicações técnicas de aplicação de cobalto na cultura de soja é de 2 a 3 g/ha (EMBRAPA, 2013) via semente, com produtos de alta solubilidade. Resultados experimentais tem mostrado grande variabilidade, tornando este tema muito discutido e diversas vezes contraditório. (PAVINATO, 2007). Campo e Lantmann (1998) mostraram que a aplicação de 0,75 g/ha de cobalto via pulverização foliar, não melhorou a nodulação e a absorção de nitrogênio pela cultura. Campo e Hungria (2002) demonstraram que a aplicação de 2,5 e 5 g/ha de cobalto junto com molibdênio nas sementes de soja, não causou incremento significativo no número de nódulos por planta em comparação com a aplicação isolada de molibdênio. Galrão (1991) também não observou alterações no rendimento de grãos de soja com a aplicação de cobalto no solo. Sfredo et al. (1997) e Campo e Lantmann (1998) realizaram o mesmo experimento via pulverização foliar e não obtiveram aumento na produção, com a aplicação de 0,75 g/ha de cobalto. Estes resultados não indicam que o cobalto não deva ser utilizado na cultura

de soja, mas que deve-se levar em consideração a quantidade e forma do suprimento de cobalto, levando-se em conta a necessidade e a translocação desse nutriente pela planta.

Sundarmoorthy et al. (2015) verificaram redução de zinco no tecido foliar das plantas ao serem aplicadas concentrações de 5 µM de cobalto, durante ensaio com feijão mungo, concluindo que o cobalto pode influenciar na redução dos teores de zinco nas folhas reduzindo o rendimento.

A necessidade de cobalto para a soja é muito pequena e a maior parte não é absorvida, sendo lixiviada ou permanecendo nos solos. Essa necessidade é cerca de 300 vezes menor do que a concentração necessária de molibdênio. As aplicações foliares apresentam menor eficiência, uma vez que este elemento possui baixa translocação na planta e são utilizados pelos nódulos, localizados no sistema radicular (LANTMANN, 2002). A concentração de vitamina B12 nos nódulo é cerca de 10 a 60 vezes mais alta que na raiz e de 100 a 700 vezes mais alta que na parte aérea, o que demonstra a importância desta vitamina na formação e manutenção dos nódulos (YOSHIDA, 1998).

A aplicação dos micronutrientes diretamente ao inoculante reduz drasticamente as células viáveis de *B. japonicum* (ALBINO; CAMPO, 2001). O suprimento de cobalto com a aplicação via pulverização foliar é prejudicada, pois este elemento possui baixa translocação na planta.

O uso de sais de cobalto possui diversos fatores negativos descritos acima, desta maneira o uso de sua forma orgânica (vitamina B12 ou cobamamida) poderia ser uma solução para estes problemas. A adição de vitamina B12 possui um custo muito elevado, tornando o uso dessa tecnologia inviável comercialmente, porém a aplicação de cobamamida com o inoculante é economicamente baixo, podendo ser incorporada ao pacote biotecnológico.

6.4 Pacote biotecnológico

No ensaio em campo, observou-se que a aplicação conjunta dos inoculantes mistos e tecnologias aplicadas aos inoculantes (tratamento 16 - *E.fredii* SMH12 *+ P.edaphicus* VKPM B 7517*+ P. fluorescens* ATCC 17552 + cobamamida + Fatores Nod / tabela 26), quando comparado aos inoculantes comerciais (trat. 3 - *B. japonicum* SEMIA 5080, trat. 4 - *B. elkanii* SEMIA 5019 e trat. 6 - *B. japonicum* SEMIA 5080 + *B. elkanii* 5019/ tabela 26) resultou em plantas 39% mais altas e produção de grãos 62% maior. O pacote tecnológico também proporcionou a produção de 64% mais vagens, o peso

médio de vagens por planta foi 50% maior, a altura média da inserção da primeira vagem foi 36% maior, o comprimento médio das vagens foi 52% maior e número médio de grãos por vagem foi 84% maior. O resultado demonstrou que o pacote biotecnológico (trat.16) apresentou resultados expressivamente maiores que as ferramentas tecnológicas disponíveis atualmente.

A maioria dos eucariontes desenvolvem interações estreitas com microrganismos, que são essenciais para o seu desempenho e sobrevivência (COLLIER; TEGEDER, 2012), porém nos agrossistemas atuais, com a diminuição drástica da biodiversidade da microbiota do solo observa-se uma queda no papel realizado pelas bactérias e fungos em fornecer nutrientes às plantas e atuar sinergicamente na promoção de um ecossistema autossustentável. As interações entre as plantas e microrganismos não são apenas cruciais para uma melhor compreensão do crescimento vegetal e seu desenvolvimento, como também para a produção agrícola sustentável.

Atualmente o grande volume de estudos sobre microrganismos associados às plantas, em diferentes culturas agrícolas, reflete o enorme interesse em promover uma mudança no manejo artificial do campo de cultivo. Recentemente o conhecimento atual dos microrganismos presentes na rizosfera e seu promissor potencial biotecnológico foi resumido por Hirsh e Mauchline (2012), Mendes et al., (2013) e Bakker et al., (2013). Bais et al. (2006) e Doombos et al. (2012) analisaram as contribuições positivas das bactérias aos solos agrícolas. Leveau (2007), Koberl et al., (2012) e Berg et al. (2013) discutiram o potencial de bactérias promotoras de crescimento vegetal e agentes de controle biológico em direção ao desenvolvimento de formas sustentáveis de manejo agrícola.

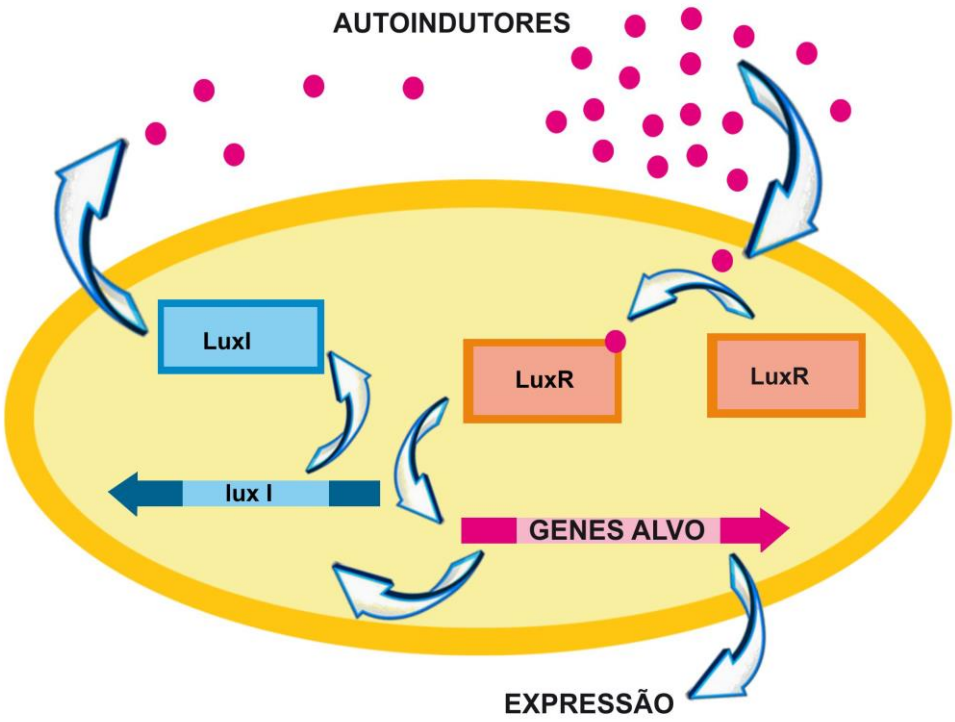
No presente trabalho foi proposto inicialmente a aplicação de bactérias que desempenhassem um papel de promoção do desenvolvimento vegetal, tendo sido testadas as bactérias *B. subtilis* ATCC 55567, *P. fluorescens* ATCC 17552 e *P. Edaphicus* VKPM B 7517. Embora sabemos atualmente que as bactérias associadas às plantas são filogeneticamente diversas, *Pseudomonas* e *Bacillus* tem sido estudados como modelos benéficos na interação planta-microrganismo, e curiosamente essa importância foi corroborada em diversos estudos metagenômicos, diferindo nos habitats nos quais ocorrem as lavouras. *Bacillus* são mais presentes em condições áridas (KOBERL et al., 2011) enquanto *Pseudomonas* são mais abundantes em ambientes húmidos (MENDES et al., 2012). *Pseudomonas* são conhecidas pela difusão no solo de pequenos antibióticos

moleculares que podem atuar em antibiose de agentes patogênicos tanto como solutos quanto substâncias voláteis. Os antibióticos e lipopeptídeos bacterianos são importantes reguladores na formação de biofilmes, sinalização, motilidade e captação de micronutrientes (MASÁK et al., 2014).

Moléculas de *quorum sensing* produzidas por *Pseudomonas* podem ser responsáveis por comunicações intra e inter-específicas na interação da interface planta- bactérias e solo-bactérias (BASSLER, 2010).

Quorum sensing (figura 35) é o mecanismo de comunicação no qual as bactérias regulam a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade populacional (BARNARD et al. 2007; DONG et al. 2007). A percepção da densidade populacional bacteriana resulta de uma comunicação intercelular, mediada pela secreção de sinais moleculares, chamados de auto-indutores, que são sintetizados pelas células individuais e reconhecidos por receptores específicos em cada célula, desta forma as bactérias percebem o tamanho da população e caracterizam certo comportamento coletivo (MCINNIS; BLACKWELL, 2011).

Figura 28 – Mecanismo de *quorum sensing.*



FONTE: Bassler (2010).

Diversos processos fisiológicos são regulados por *quorum sensing*, como a produção de fatores de virulência, bioluminescência, biossíntese de antibióticos, formação de biofilmes, assim como a ativação de processos do metabolismo secundário (MARKETON; GONZALEZ, 2003).

Ao detectar a concentração dos auto-indutores, a bactéria percebe o tamanho da população. Alcançada a produção limite de auto-indutores, estes passam a regular a transcrição de genes-alvo (GONZALEZ; MARKETON, 2003). As moléculas de *quorum sensing* podem atuar como agentes de biocontrole, inibindo a proliferação de microrganismos patogênicos, ao produzir moléculas em uma concentração que seria reconhecida apenas quando estas bactérias alcançassem uma densidade populacional crítica (BRELLES-MARINO; BEDMAR, 2001).

Em geral, as moléculas de *quorum sensing* são lactonas homoserinas (AHL), porém existem outros auto-indutores, como peptídeos modificados pós-tradução em bactérias gram-negativas, ou quinolonas, furanonas e butirolactonas. (Cha et al. 1998).

Diferentes parâmetros relacionados com a fixação biológica de nitrogênio, tais como eficiência da nodulação, desempenho simbiótico e produção de fatores Nod, são controlados por *quorum sensing* (BASSLER, 2010).

As moléculas de *quorum sensing* poderão ser ferramentas importantes na obtenção de altas concentrações celulares, assim como tornar mais competitivas bactérias de interesse agronômico (BASSLER, 2010).

As moléculas de *quorum sensing* podem mudar o transcriptoma da planta, modificar o crescimento da raiz e induzir resistência sistêmica contra fitopatógenos (BASSLER, 2010) podendo explicar muitos dos benefícios observados na aplicação dos inoculantes mistos no presente estudo.

De modo geral, logo após a inoculação de bactérias no solo ou sementes, a população diminui rapidamente, o que pode ser explicado pela competição com a microbiota nativa, que torna-se um dos principais obstáculos no sucesso de novos inoculantes. Assim, durante o desenvolvimento de novos bioprodutos para o agronegócio a sobrevivência dos microrganimos introduzidos no agrossistema devem ser levada em consideração.

Na última década foram desenvolvidos diversos inoculantes para aplicação em soja, em diferentes partes do mundo, porém no Brasil os produtos disponíveis se resumem às estirpes recomendadas de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*.

A falta de novas ferramentas tecnologias resulta na estagnação do desenvolvimento de um manejo mais sustentável do agrossistema. Atualmente os estudos com *PGP*s em soja concentram-se na co-inoculação com as bactérias do gênero *Azospirillum,* principalmente a espécie *A. Brasilense*, que produz hormônios vegetais, tais como auxinas, giberelinas, citocininas (MEHDIPOUR et al., 2012). Tem-se verificado um aumento na densidade de pêlos radiculares e aparecimento de raízes secundárias em plantas colonizadas por essas bactérias, o que resulta num aumento da absorção de água e nutrientes, elevando a capacidade da planta de produzir e suportar estresses ambientais, até mesmo de resistência a geadas (BALDANI et al., 1983; KAPULNIK et al.,1987). As bactérias deste gênero são capazes de acumular poli-β hidroxibutirato (PHB), um material de reserva que lhes permite resistir a condições de estresse ambiental (OKON et al., 1985).

Diversos fatores limitam o sucesso da fixação do nitrogênio, como temperaturas elevadas, estresse hídrico, deficiências minerais, com destaque para a acidez do solo e toxicidade por alumínio e manganês (MOREIRA et al., 2008). Um manejo adequado a cada sistema agrícola, envolvendo além das bactérias PGPs, simbióticas e associativas, depende ainda do conhecimento mais preciso da dinâmica do nitrogênio no solo em diferentes períodos do ano e tipos de manejo. O nitrogênio acumulado em leguminosas condicionadoras de solo contribuem também para a cultura subsequente, podendo haver um sincronismo entre a liberação de nutrientes, principalmente nitrogênio, pela leguminosa e a absorção pela cultura em sucessão.

7 CONCLUSÃO

A co-inoculação de *E. fredii, P. edaphicus* e *P. fluorescens*, com as tecnologias aplicadas ao inoculante contendo o rizóbio, fatores Nod e cobamamida, mostrou benefícios na nodulação, desenvolvimento e rendimento da soja.

Os inoculantes mistos contendo *E. fredii*, *P. edaphicus* e *P. fluorescens* apresentaram um aumento de 84 % no número de nódulos, quando comparado ao tratamento usando somente as bactérias simbiontes ondulantes em soja (*E. fredii, B. japonicum* e *B. elkanii*).

O rendimento dos grãos de soja quando inoculadas com *B. japonicum* e *E. fredii* contendo fatores Nod foram 18% maiores que os tratamentos apenas com as bactérias, em condições de casa-de-vegetação, enquanto a aplicação de cobamamida aumentou em 26% o número de nódulos.

A aplicação do pacote biotecnológico resultou num rendimento de grão de soja, 63% superior ao tratamento atualmente disponível (inoculantes comerciais), podendo ser uma opção economicamente viável para aumentar a produção da agricultura nacional, sem expandir a área de cultivo.

REFERÊNCIAS *

ABIOVE, Coordenadoria de economia e estatística. 2013. Disponível em: <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica;area=NC0yLTE=>. Acesso em: 23 jul. 2014.

AERON, A. et al. Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiology. In: AERON, A. et al. **Bacteria in agrobiology:** crop ecosystems. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 1-36.

AGUILAR, O. M. et al. Interaction between Host and Rhizobial Strains: Affinities and Coevolution. **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2, p. 203, 2015.

ANPII, 2013. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão: fundamentos e resultados recentes. In: I Simpósio de Nutrição e Adubação da Cultura do feijão: Piracicaba, ESALQ/USP. Disponível em <http://www.anpii.org.br>. Acesso em 20 jul, 2014.

ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 36, n. 3, p. 527-534, 2001.

ALEXANDER, M. Transformaciones microbianas del fósforo. (p. 355-371). En: **Introducción a la microbiología del suelo.** AGT Editor, México, 1980.

ALSTON, J. M.; PARDEY, P.G. Agriculture in the Global Economy. **The Journal of Economic Perspectives**, v. 28, n. 1, p. 121-146, 2014.

ANDREEVA, I. N. et al. Effect of *Azospirillum brasilienses* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. **Soviet Plant Physiology,** v. 38, p. 897-904, 1991.

ANDREW, C. S.; ROBINS, M. F. The effect of phosphorus on the growth and chemical composition of some tropical legumes. II. Nitrogen, calcium, magnesium, potassium, and sodium contents. **Crop and Pasture Science,** v. 20, p. 675-685, 1969.

ASSIS, S. M. P. et al. Ação de rizobactérias no crescimento de rabanete e no controle biológico da podridão negra e da antracnose. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 38, p. 843-850, 1995.

BACENETTI, J. et al. Impact of cropping system and soil tillage on environmental performance of cereal silage productions. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, p. 49-59, 2015.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAKKER, P. A. H. et al. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. **Biotic interactions and soil-borne diseases**, v. 23, p. 217-230, 1991.

BAKKER P. A. et al. The rhizosphere revisited: root microbiomics. **Front. Plant Sci.** v.30, p. 165, 2013.

BALDANI, V. L. D. et al. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen in wheat. **Canadian Journal of Microbiology,** v.29, n.8, p.869-881, 1983.

BAIS H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 57 p. 233–266, 2006.

BARNARD, A. M. L. et al. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. **Phil. Trans. R. Soc. B,** v. 362, p.1165–1183, 2007.

BÁRBARO, I. M. et al. Resultados preliminares da co-inoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011.

BARBIERI, G.; DELAZERI, P. Influência de diferentes fitohormônios na propagação vegetativa de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus badjensi.s* Beuzev & Welch. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n. 1, p. 31, 2014.

BASAK, P. et al. Denaturation properties and folding transition states of leghemoglobin and other heme proteins. **Biochemistry Moscow**, v. 80, n. 4, p. 463-472, 2015.

BASAK, B. B.; BISWAS, D. R. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. **Plant and Soil**, v. 317, p. 235-255, 2009.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil,** v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BASSLER, B. L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell** v. 109,p. 421–424, 2002.

BERG G., et al. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environ. Microbiol.** v.7,p. 1673–1685, 2005.

BERG, G. Beyond borders: investigating microbiome interactivity and diversity for advanced biocontrol technologies. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 5-7, 2015.

BEZERRA, G. et al. Uso de *Bacillus* spp. No controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade brs valiosa rr. **Revista Agroecossistemas**, v. 5, n. 1, p. 68-73, 2013.

BEWLEY, J. D; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in Relation to Germination: Volume 2: Viability, Dormancy and Enviromental Control**. New York, Springer Science & Business Media, 2012.

BHAR, K. et al. Phosphorylation of Leghemoglobin at S45 is Most Effective to Disrupt the Molecular Environment of Its Oxygen Binding Pocket. **The Protein Journal**, v. 34, n. 2, p. 158-167, 2015.

BIATE, D. L. et al. Genetic Diversity of Soybean Root Nodulating Bacteria. In: BIATE, D. L. et al. **Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture**. Oxford, Springer International Publishing, 2014. p. 131-145.

BIEGELMEYER, U. H. et al. Consumo de Energia Hidrelétrica no Meio Rural Brasileiro: Uma Visão Sustentável. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, 2015.

BISHNOI, U. et al. Draft genome sequence of a natural root isolate, *Bacillus subtilis* UD1022, a potential plant growth-promoting biocontrol agent. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. 15, 2015.

BJORNSSON, R. et al. Molybdenum L-Edge XAS Spectra of MoFe Nitrogenase. **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie,** v. 641, n. 1, p. 65-71, 2015.

BLOWERS, A. **Planning for a sustainable environment.** Routledge, 2013.

BOÞGELMEZ-TINA, G. *Quorum Sensing* in Gram Negative Bacteria, **Turk J Biol** v.27 p. 85-93, 2003.

BRELLES-MARINO, G.; BEDMAR, E. J. Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. **J. Biotechnol**, v.91, p.197–209, 2001.

BRISBANE, P. G. et al. Inhibitionof fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and fungicides. **Soil Biology and Biochemistry**., v. 21, n. 8, p. 1019-1025, 1989.

BROUGHTON, W. J. et al. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: Agricultural uses and Perspective. **Plant and Soil,** v. 252, p. 129-137, 2003.

CAMPO R. J.; LANTMANN, A. F. Efeitos de micronutrients na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.8, p.1245-1253, 1998.

CAMPO, R. J et al. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas na nodulação e fixação simbiótica N2. **Embrapa Soja**, 1999.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Inoculação da soja em sistema de plantio direto.** Anais 2000, 2000, p. 146-160.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Importância dos micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio. **Informações Agronômicas**, n. 98, 2002.

CANBOLAT, M. et al. Effect of plant growth-promoting bacteria andsoil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake,soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 3, p. 350-357, 2006.

CARVAJAL, J. E. V. et al. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín**, v. 68, n. 1, p. 7441-7450, 2015.

CASTILLO, P. et al. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum.* In: CASTILLO, P. et al. **Handbook for *Azospirillum.*** Springer International Publishing, 2015. p. 115-138.

CASSIDY, M. B. et al. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of industrial Microbiology**. v.16, p. 79-101, 1996.

CASSMAN, K. G. et al. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum*; strain differences in phosphate storage and utilization. **Soil Science Society of America Journal,** v.45, p. 517-520. 1981.

CATTELAN, A. J. Aumento no desenvolvimento de plantas de soja através da inoculação com bactérias promotoras de crescimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24., 1993, Goiânia, GO. **Resumos...** 1993. p. 341-342.

CHANG, W.; HUNGRIA, M. Soybean Production in the Americas. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer International Publishing, 2015. p. 393-400.

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

CHEN, C. et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and Pythium aphanidermatum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 13-23, 2000.

CHEN, L. et al. Cloning and Analysis of Fd-GOGAT Genes from Different Soybean Varieties. **Soybean Science**, v. 3, p. 6, 2011.

CHEN, W. et al. The effects of gibberellins and mepiquat chloride on nitrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum.* **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 37, n. 1, p. 1-11, 2015.

COLLIER R.; TEGEDER, M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. **The Plant Journal**, v. 72, n. 3, p. 355-367, 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2013/2014. Disponível em: <http//www.conab.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2014

CHRISTENSEN, C. The innovator's dilemma: when new technologies cause great firms to fail. **Harvard Business Review Press**, 2013.

CRUSCIOL, C. A. C. et al. Aplicação foliar de ácido silícico estabilizado na soja, feijão e amendoim. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 404-410, 2013.

DALLA CORTE, G. et al. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos no controle de fitonematoides em soja. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1534-1540, 2014.

DAN, L. G. M. et al. Tratamento de sementes com inseticida e a qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 45-51, 2012.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 215-217, 2000.

DING, Y.; OLDROYD, G. E. D. Positioning the nodule, the hormone dictum. **Plant Signalling & Behavior,** v. 4, n. 2, p. 89–93, 2009.

D'HAEZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v. 12, n. 6, p. 79-105, 2002.

DHURIGAI, N. et al. Structure determination of Leghemoglobin using Homology Modeling. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 10, p. 177-187, 2014.

DJORDJEVIC, M. A. et al.. Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 17, p. 5171-5181, 2015.

DONG, Y. H. et al. Quorum quenching microbial infections: mechanisms and implications. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 362, p.1201–1211. 2007

DOORNBOS R. F. et al. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agron. Sustain. Dev.* v.32, p.227–243, 2012.

EHRHARDT, D. W.; WAIS, R. Hemoglobin-the missing link. **Cell**, v. 85, p. 673-681, 1996.

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja: Região Central do Brasil 2012 e 2013. **Embrapa Soja,** Londrina, p. 1-275, 2011.

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja: Região Central do Brasil 2014, **Embrapa Soja,** Londrina, p. 1-265, 2013.

FAVARIN, J. L.; MARINI, J. P. Importância dos micronutrientes para a produção de grãos. **Sociedade Nacional de Agricultura,** Rio de Janeiro, 2000.

FARUQUE, O. M. et al. Identification of *Bradyrhizobium elkanii* Genes Involved in Incompatibility with Soybean Plants Carrying the Rj4 Allele. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6710-6717, 2015.

FERGUSON, B. J.; MATHESIUS, U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 7, p. 770-790, 2014.

FERREIRA, F. F. et al. Análise da matriz energética e econômica das culturas de arroz, soja e trigo em sistemas de produção tecnificados no Rio Grande do Sul; **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, p. 380-385, 2014.

FLIEGMANN, J.; BONO, J. Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors. **Glycoconjugate Journal**, v. 32, n. 7, p. 455-464, 2015.

FONSECA, V. F. et al. Screening of Bacillus Spp. Isolated From Amazon Basin As Potential Antagonist of Toxigenic *Fusarium graminearum.* **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 467-468, 2014.

FOURQUEZ, M. et al. Microbial iron uptake in the naturally fertilized waters in the vicinity of Kerguelen Islands: phytoplankton–bacteria interactions. **Biogeosciences Discussions**, v. 11, n. 10, p. 15053-15086, 2014.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Sum. Phytopathol**., v.23, p. 36-41, 1997.

FREIXAS, J. A. et al. Ureides levels in soybean plants with different inoculants and submitted to water deficit. **Cultivos Tropicales**, v. 32, n. 2, p. 122-135, 2011.

FROEHLICH, D. M.; FEHR, W. R. Agronomic performance of soybeans with differing levels of iron deficiency chlorosis on calcareous soil. **Crop Science,** v. 21, p. 438–441, 1981.

GALRÃO, E. Z. Micronutrientes e cobalto no rendimento da soja em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15. p.117-120, 1991.

GARCÍA, N. et al. Effect of different inoculants on soybean nodulation grown in stress condition. **Cultivos Tropicales**, v. 35, n. 4, p. 45-51, 2014.

GATES, C. T. Nodule and plant development in *Stylosanthes humilis* HBK: Symbiotic response to phosphorus, and sulfur. **Aust. J. Bot.** v.27, p. 203-215, 1987.

GENC, S. et al. The adverse effects of air pollution on the nervous system. **Journal of Toxicology**, v. 2012, 2012.

GIARRATANA, F. et al. Effect of siderophores against *E. coli* O157: H7. **Italian Journal of Food Safety,** v. 1, n. 4, p. 57-59, 2012.

GIL-QUINTANA, E. et al. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 8, p. 2171-2182, 2013.

GOMIERO, T. et al. Is there a need for a more sustainable agriculture? **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 1-2, p. 6-23, 2011.

GONZALEZ, J. E. ; MARKETON, M. M. *Quorum sensing* in nitrogen-fixing rhizobia. Microbiol. **Mol. Biol. Rev**, v. 67, p.574–592, 2003.

GONZÁLEZ-RIVERO, M. et al. The Catlin Seaview Survey–kilometre-scale seascape assessment, and monitoring of coral reef ecosystems. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 24, n. 2, p. 184-198, 2014.

GOPALASUBRAMANIAM, S. K. et al. Soybean dihydrolipoamide dehydrogenase (ferric leghemoglobin reductase 2) interacts with and reduces ferric rice non-symbiotic hemoglobin 1. **Sciencejet**, v. 2, 2013.

GOSWAMI, D. et al. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 66-75, 2014.

GOURION, B. et al. *Rhizobium*–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 186-194, 2015.

GRAHAM, M. J. et al. 17 Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. **Eugene Rosenberg**, 2013.

GUERRA, C. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de soja em função da adubação com fósforo, molibdênio e cobalto. **Acta Scientarum: Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 91-97, 2006.

GUNDLACH, H. et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 6, p. 2389-2393, 1992.

HALVERSON, L. J. et al., Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of fied-grown soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v.25, p. 485-493, 1993.

HASSEN, A. I. Using appropriate rhizobium strains for oilseed legumes: agronomy. **Oilseeds Focus**, v. 1, n. 1, p. 8-9, 2015.

HERES, D. R. et al. Deforestation in Private Lands in Brazil and Policy Implications for Redd Programs: An Empirical Assessment of Land use Changes within Farms using an Econometric Model 1. **International Forestry Review**, v. 15, n. 2, p. 169-181, 2013.

HIRSCH P. R.; MAUCHLINE T. H. Who's who in the plant root microbiome? **Nat. Biotechnol.** v. 30 p. 961–962, 2012.

HOHNADEL, D.; MEYER, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. **J. Bacteriol.,** v. 170, p. 4865-4873, 1988.

HOLLAND., P.L. Techniques for Functional and Structural Modeling of Nitrogenase-Nitrogen Fixation, **Methods in Molecular Biology**, v. 766, p. 249-263. 2011.

HOPKINS, B. G. et al. Variable inhibition of iron uptake by oat phytosiderophore in five soybean cultivars. **J. Pl. Nutrition**, v. 15, p. 125-135, 1992.

HUNGRIA, M. et al. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Embrapa Soja, Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 48p.

HUNGRIA M.; STACEY G. Molecular signals exchange between host plants and rhizobia - basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biol. Biochem***.* v. 29 p. 819–830, 1997.

INDRASUMUNAR, A. et al. Nodulation factor receptor kinase 1α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr). **The Plant Journal**, v. 65, p. 39-50, 2011.

JANCZAREK, M. et al. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology,** v. 85, p. 94-113, 2015.

JJEMBA, P. K. & ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 623-632, 1999.

KAGALE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metel against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae.* **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 91-100, 2004.

KAMILOVA, F. et al. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 3, p. 250-256, 2006.

KAPULNIK, Y. et al. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. **Plant Physiology, Rockville**, v. 84, p.1193-1196, 1987.

KASSEM, M. A. et al. Definition of soybean genomic regions that control seed phytoestrogen amounts. **BioMed Research International**, v. 2004, n. 1, p. 52-60, 2004.

KASSEM, M. A. et al. An updated 'Essex'by 'Forrest' linkage map and first composite interval map of QTL underlying six soybean traits. **Theoretical and applied genetics**, v. 113, n. 6, p. 1015-1026, 2006.

KAUR, H. et al. Tapping of native *Bradyrhizobium* and *Ensifer* sp. diversity for functional traits in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Legume Research-An International Journal**, v. 37, n. 6, p. 651-657, 2014.

KIM, J. et al. Increased expression of Fe-chelatase leads to increased metabolic flux into heme and confers protection against photodynamically induced oxidative stress. **Plant Molecular Biology**, v. 86, n. 3, p. 271-287, 2014.

KLOEPPER, J. W. et al. Enhanced plat growth by siderophores produced by plant growth rhizobacteira. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.

KLOEPPER, J. W. et al. **Inoculants including *Bacillus* bacteria for inducing production of volatile organic compounds in plants**. U.S. Patent n. 8,445,255, 21 de maio, 2013.

KÖBERL M. et al . "Using ecological knowledge and molecular tools to develop effective and safe biocontrol strategies," In: **Pesticides in the Modern World–Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment** / *Book 5*., 2012.

KURUKULASURIYA, P.; ROSENTHAL, S. **Climate change and agriculture**: a review of impacts and adaptations. 2013.

LAMPTEY, S. et al. Response of soybean (*Glycine max*) to rhizobial inoculation and phosphorus application. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 72-77, 2014.

LANTMANN, A. F. Nutrição e produtividade da soja com molibdênio e cobalto. **Artigos EMBRAPA, Coletânea rumos e debates**, 2002.

LARRAINZAR, E. et al. Deep sequencing of the Medicago truncatula root transcriptome reveals a massive and early interaction between Nodulation factor and ethylene signals. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 233-265, 2015.

LEE, H. I. et al. Inactivation of the lpcC gene alters surface-related properties and symbiotic capability of *Bradyrhizobium japonicum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 9-16, 2014.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.,** v. 24, p. 187-209, 1986.

LEVEAU J. H. J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 119, p. 279–300, 2007.

LIBAULT, M. et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model Glycine max, and its use in comparative analyses in plants. **The Plant Journal**, v. 63, n. 1, p. 86-99, 2010.

LIN, Y. et al. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. **Biological Control**, v. 71, p. 7-15, 2014.

LIANG, Y. et al. Lipochitooligosaccharide recognition: an ancient story. **New Phytologist**, v. 204, n. 2, p. 289-296, 2014.

LIBAULT, M. The carbon-nitrogen balance of the nodule and its regulation under elevated carbon dioxide concentration. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LLOYD, J. M. **Use of microorganisms in conjunction with seeds**. U.S. Patent n. 4,367,609, 11 jan. 1983.

LOPES, M. M. et al. Análise da competitividade e das exportações agrícolas brasileiras para a China: uma análise do complexo soja e fumo. **Revista Uniabeu**, v. 6, n. 13, p. 189-208, 2013.

LOPRETO, C. R. et al. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de uma cepa de *Rhizobium japonicum.* **Ann. Soc. Cient. Arg.,** v. 193, p 35-47, 1972.

LUDWIG, J. et al. Potential of microbiolization of rice seeds with rhizobacteria for root-knot nematode biocontrol. **Tropical Plant Pathology,** v. 38, n. 3, p. 264-268, 2013.

LUPWAYI, N. Z. et al. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, v.15, n. 2, p. 289-321, 2005.

MABOOD, F. et al. *Bradyrhizobium japonicum* preincubated with Methyl jasmonate increases soybean nodulation and nitrogen fixation. **Agron. J**, v. 98, p. 289-294, 2006a.

MABOOD, F. et al. Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and Bradyrhizobium japonicum increases soybean (Glycine max L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. **Field crops research**, v. 95, n. 2, p. 412-419, 2006b.

MACIEL, C. G. et al. Antagonism of *Trichoderma* SPP. and Bacillus subtilis (UFV3918) to *Fusarium sambucinum* in *Pinus elliottii* engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

MANTOVANELLO, C. M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 123-126, 1994.

MARCONDES J. A. P.; CAIRES E. F.; Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo da soja . **Bragantia,** v. 64, n. 4, 2005.

MASÁK, J. et al. Pseudomonas biofilms: possibilities of their control. **FEMS microbiology ecology**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014.

MATOS, A. S. **Análise das intoxicações exógenas por agrotóxicos no Brasil, entre 2007 a 2012.** 2014.

MB AGRO. **Soja Intacta:** uma visão econômica dos benefícios da adoção da nova tecnologia**.** 2013.

MCINNIS C. E.; BLACKWELL H. E. "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Abiotic, Non-Lactone Modulators of LuxR-type Quorum Sensing." **Bioorg. Med. Chem.** *v.* 19, p. 4812-4819, 2011.

MEHDIPOUR M., M. J.et al. Enhanced auxin production by Azospirillum pure cultures from plant root exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 985-994, 2012.

MENDES R. et al. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol. Rev***,* v. 37, p. 634–663, 2013.

MENGEL, K.; KIRKBY J. Principles of Plant Nutrition. **Dordrecht: Kluwer Academic,** v. 5 p. 621-638. 2001.

MERCADO-BLANCO, J. *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. In: **Pseudomonas.** Amstedam, Springer Netherlands, 2015. p. 121-172.

MEYER, J. M.; ABDALLAH, M. A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties**. Journal of General Microbiology**, v. 107, p. 319-328, 1978.

MINAMI E. et al. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. **Plant J.,** v. 10, p. 23–32, 1996.

MO, B.; LIAN B. Hg(II) adsorption by *Bacillus mucilaginosus*: mechanism and equilibrium parameters. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 27, n. 5, p. 1063-1070, 2011.

MOHANTY A. K. et al. Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World. **Journal of Polymers and the Environment,** v. 10, p. 19-26, 2002.

MORANDI, D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. **Plant and soil**, v. 185, n. 2, p. 241-251, 1996.

MOREIRA, F.M.S. et al. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros.** 2008.

MORRIS, D. R. et al. Indigenous soil factors influencing iron chlorosis of soybean in calcareous soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.,** v. 54, p. 1329–1336, 1990.

MOURA, L. T. R. et al. Epidemiological profile of cases of pesticide poisoning. **Journal of Nursing UFPE on line** v. 8, n. 7, p. 2333-2341, 2014.

MORETTO, A.; COLOSIO, C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 383-391, 2011.

MPEPEREKI, S. et al. Soyabeans and sustainable agriculture: promiscuous soyabeans in southern Africa. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2, p. 137-149, 2000.

MUÑOZ, N. et al. Structure and biological activities of lipochitooligosaccharide nodulation signals produced by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 under saline and osmotic stress. **Biology and fertility of soils**, v. 50, n. 2, p. 207-215, 2014.

NAHAS, E. et al. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 567-572. 1994.

NAVARRO, G. et al. Can cover crops modify the pattern of nodulation of soybean (Glycine max L.)?, **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 41, n. 1, p. 47-52, 2015.

NEUDORF, S. J. Reaction of the hemochromogen test with the heme protein leghemoglobin obtained from soybean root nodules. **Canadian Society of Forensic Science Journal**, v. 48, n. 1, p. 36-45, 2015.

NORBERG, J.; CUMMING, G. S. (Ed.). **Complexity theory for a sustainable future.** Columbia University Press, 2013.

OHKAMA-OHTSU, N. et al. Peribacteroid solution of soybean root nodules partly induces genomic loci for differentiation into bacteroids of free-living *Bradyrhizobium japonicum* cells. **Soil Science and Plant Nutrition**, p. 1-10, 2015.

OKAZAKI, S. et al. *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. **The ISME journal,** 2015.

OKON, Y. et al. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. In: Bothe, H.; Debruijn, F. J. & Newton, W. E., eds. **Nitrogen fixation**: hundred years after. Stuttgard, Gustav Fischer, p. 741-748, 1988.

OWEN, D. et al. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphrous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41-54, 2015.

PANNEERSELVAM, P. et al. 14 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Tool to Combat Plant Pathogenic Bacteria. **Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria**, p. 273, 2015.

PAVINATO, P. S. **Dinâmica do fósforo no solo em função do manejo e da presença de resíduos em superfície.** Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 145p. (Tese de Doutorado), 2007.

PERRET, X. et al. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 180 – 201, 2000.

PESCE, A. et al. Structural heterogeneity and ligand gating in ferric Methanosarcina acetivorans protoglobin mutants. **IUBMB life**, v. 63, n. 5, p. 287-294, 2011.

PIETERSE, C. M. J & VAN WEES, S. CM. Induced disease resistance. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions.** Springer International Publishing, 2015. p. 123-133.

POWAR, V. K. & JAGANNATHAN, V. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 151, p. 1102-1108, 1982

PRAKAMHANG, J. et al. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology,** v. 85, p. 38-49, 2015.

PRASAD, R. et al. Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health. In: **Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants.** Springer International Publishing, p. 247-260. 2015.

PRATT, P. D. & CENTER, T. D. Biocontrol without borders: the unintended spread of introduced weed biological control agents. **Bio Control,** v. 57, n. 2, p. 319-329, 2012.

PRIETO, P. et al. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 2, p. 435-445, 2011.

QI, X. et al. Grain yield and apparent N recovery efficiency of dry direct-seeded rice under different N treatments aimed to reduce soil ammonia volatilization. **Field Crops Research**, v. 134, p. 138-143, 2012.

RAMAMOORTHY V.; SAMIYAPPAN R. Induction of defenserelated genes in *Pseudomonas fluorescens* treated chilli plants in response to infection by *Colletotrichum capsici.* **Journ. of Mycology and Plant Path**., v. 31, p. 146–155, 2001.

REDDY, P. P. Causes of Climate Change. In: REDDY, P. P. **Climate Resilient Agriculture for Ensuring Food Security.** Mumbai, Springer India, 2015. p. 17-26.

RODRIGUES, A. C. et al. *Rhizobium tropici* exopolysaccharides as carriers improve the symbiosis of cowpea-*Bradyrhizobium-Paenibacillus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 37, p. 2037-2050, 2015.

ROUGHLEY, R. J. The preparation and use of legume seed inoculant. **Plant and Soil.** v. 32 p. 676-701, 1970.

SANJUAN, J. et al. *Bradyrhizobium japonicum* strains produce multiple 2-0-methylfucose-containing lipo-oligosaccharide. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, WE,. EDS. **New horizons in nitrogen fixation.** Berlin, Dordrecht Kluwer Academic Publishers, p. 177-182, 1993.

SCHMIDT, J. et al. Beneficial microorganisms for soybean (*Glycine max* (L.) Merr), with a focus on low root-zone temperatures. **Plant and Soil**, p. 1-35, 2015.

SEN, B. K. et al. Removal of Phenolic Compounds from Aqueous Phase by Adsorption onto Polymer Supported Iron Nanoparticles. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 93, n. 5, p. 549-554, 2014.

SFREDO, G. J. et al. Eficácia de produtos contendo micronutrientes, aplicadas via semente, sobre produtividade e teores de proteína da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 41-45, 1997.

SHABAYEV V. P. et al. CO2 exchange in soybean plants and symbiotic nitrogen fixation upon joint inoculation with nodule bacteria and either rhizosphere pseudomonads or endomycorrhizal fungi. **Biol Bull Russian Acad Sci** v. 22, p. 576–583, 1995.

SHETTY, P. K. et al. Farmer's health externalities in pesticide use predominant regions in India. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 2011.

SICZEK, Anna et al. The response of rhizosphere microbial properties to flavonoids and Nod factors. **Soil & Plant Science**, v. 65, n. 2, p. 125-131, 2015.

SIDDIQUI, I. et al. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5646-5649, 2005.

SINGH, J. S. et al. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, ecosystems & environment,** v. 140, n. 3, p. 339-353, 2011.

SINGLETON, P.W. et al. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum.* **Soil Sci. Soc. Am. J.** v. 49, p. 613-616, 1985.

SILVA, V.N. et al. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Acta Science Agronomy,** v. 28, p. 407-412, 2006.

SILVA, V.N. et. al. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. **Acta Science Agronomy,** v. 29, p. 331-338, 2007.

SIVASAKTHI, S. et al. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **Afr J Agric Res**, v. 9, p. 1265-1277, 2014.

SPRENT J. I.; **Nodulation in Legumes.** Kew, Royal Botanic Gardens, 2001**,** p146.

SREE, K. S. et al. Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed Lemna minor–Morphology, ion uptake, and starch accumulation. **Chemosphere**, v. 131, p. 149-156, 2015.

STACEY G. et al. Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Curr Opin Plant Biol**, v.9. p. 110–121, 2006.

STAEHELIN, C.; KRISHNAN, H. B. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. **Biochemical Journal**, v. 470, n. 3, p. 263-274, 2015.

STAMFORD, N. P. et al., Nitrogen fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. **Tropical Grasslands,** v. 37, n. 2, p. 1- 9, 2003.

STANIER, R. Y. et al. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology,** v. 43, p. 159-271, 1966.

STAUDT, A. K et al; Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici.* **Archives of Microbiology,** v. 194, n. 3, p. 197-206, 2012.

STEIN, R. L. B., **Efeito de *Pseudomonas fluorescentes* no controle in vitro de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro** (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1988.

STYRIAKOVA, I. et al. The release of iron-bearing minerals and dissolution of feldspar by heterotrophic bacteria of *Bacillus* species. **Ceramics Silicaty**, v. 47, p. 20-26. 2003.

STRENG, A., et al. Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling, **Plant signaling and behavior**, v.6, p. 1510-1514, 2011.

SUN, H. et al. Effects of bisphenol A on ammonium assimilation in soybean roots. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 12, p. 8484-8490, 2013.

SUNDARMOORTHY, P. et al. Chromium induced changes in Soybean (*Glycine max* L.) metabolism. **World Scientific News**, n. 10, p. 145-178, 2015.

SUTTON, M. A.; BLEEKER, A.. Environmental science: The shape of nitrogen to come. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 435-437, 2013.

THAKUR, B. et al. Polyaniline nanoparticle based colorimetric sensor for monitoring bacterial growth. **Sensors and Actuators B: Chemical,** v. 207, p. 262-268, 2015.

TITTABUTR, P. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**, v. 33, n. 1, p. 69-77, 2007.

TORRES, A. R. et al. Genetic structure and diversity of a soybean germplasm considering biological nitrogen fixation and protein content. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 47-52, 2015.

TUOMISTO, H. L.; TEIXEIRA, M. M. Joost. Environmental impacts of cultured meat production. **Environmental Science & Technology,** v. 45, n. 14, p. 6117-6123, 2011.

WALLACE, A. et al. High levels of four heavy metals on the iron status of plants. **Communications of Soil and Plant Analasys.** v.7, p. 43-46, 1976.

WANG, J. et al. A soybean acyl carrier protein, GmACP, is important for root nodule symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 5, p. 415-423, 2014.

VAN VLIET, N. et al. Trends, drivers and impacts of changes in swidden cultivation in tropical forest-agriculture frontiers: a global assessment. **Global Environmental Change**, v. 22, n. 2, p. 418-429, 2012.

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

VINCENT, J. M. et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.** 1970.

VLASSAK, K. M. et al. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 2, p. 163-229, 1997.

WHITTLE, P. et al. Surveillance for soilborne microbial biocontrol agents and plant pathogens. **Biosecurity Surveillance: Quantitative Approaches**, n. 6, p. 181, 2015.

WOLTZ ,S. S. Non parasitic plant pathogens . **Annu . Rev. Phytopathol**, v.16, p.403-430. 1978.

ZAIDI, A. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231-239, 2015.

ZAMBERLAN, J. et al. Produção e manejo agrícola: impactos e desafios para sustentabilidade ambiental. **Eng. Sanit. Ambient**, v. 19, p. 95-100, 2014.

ZHANG, Z. et al. The roles of tetrapyrroles in plastid retrograde signaling and tolerance to environmental stresses. **Planta**, v. 242, n. 6, p. 1263-1276, 2015.

ZERPA, M. et al. Effects of Bradyrhizobium japonicum Inoculants on Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Growth and Nodulation. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 7, p. 193-199, 2013.

ZHAO, X. et al. Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS. **Food Chemistry,** 2015.

YOSHIDA, S. Rhizobial production of vitamin B12 active substances and their localization in some leguminous plants. **Soil Biology, Japanese Journal of Soil and Plant Nutrition,** v.69, p. 435-444, 1998.

YOUSEIF, S. H. et al. Symbiotic Effectiveness of *Rhizobium (Agrobacterium*) Compared to *Ensifer (Sinorhizobium*) and *Bradyrhizobium* Genera for Soybean Inoculation under Field Conditions. **Research Journal of Microbiology,** v. 9, n. 3, 2014.