

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"**

FACULDADE DE ENGENHARIA

UNESP – CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* EM SOJA EM ÁREAS
INOCULADAS OU NÃO COM *Azospirillum brasilense* EM ANOS CONSECUTIVOS

GABRIELA DE ALMEIDA BOLDRINI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andreotti

ILHA SOLTEIRA – SP JUNHO DE 2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"**

FACULDADE DE ENGENHARIA

UNESP – CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* EM SOJA EM ÁREAS
INOCULADAS OU NÃO COM *Azospirillum brasilense* EM ANOS CONSECUTIVOS

GABRIELA DE ALMEIDA BOLDRINI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andreotti

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Engenharia
da Unesp – Câmpus de Ilha Solteira,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Engenheira Agrônoma.

ILHA SOLTEIRA – SP JUNHO DE 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Boldrini, Gabriela de Almeida.

B687i Inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em soja em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* em anos consecutivos / Gabriela de Almeida Boldrini. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024

40 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia agrônoma)
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia , Ilha Solteira, 2024

Orientador: Marcelo Andreotti

Inclui bibliografia

1. Glycine Max L. Merril. 2. Avena strigosa. 3. Simbiose . 4. Rizóbios. 5. Nodulação .

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

CURSO DE ENGENHARIA AGRONÓMICA

ATA DA DEFESA - TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em soja em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum* brasileiro em anos consecutivos

ALUNO: Gabriela de Almeida Boldrini RA: 182054497

ORIENTADOR: Marcelo Andreotti

Aprovado OÓ - Reprovado () pela Comissão Examinadora com Nota:

Comissão Examinadora:

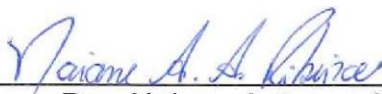


Prof. Dre Marcelo Andreotti

Presidente (Orientador)



Dra. Viviane Cristina Modesto



Dra. Naiane Antunes Alves Ribeiro



Gabriela de Almeida Boldrini

Ilha Solteira, 19 de junho de 2024.

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso aos meus pais, Darley Boldrini (em memória) e Valquíria de Fátima O. de Almeida Moreira, pelo amor incondicional e apoio constante. Ao meu orientador, pelo incentivo incansável. Aos professores, pela contribuição valiosa. Agradeço a Deus por me guiar e não deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada aprendizado nesta jornada. Sua presença constante foi meu suporte, nunca me deixando desistir. Dedico minha fé a Ele, que conhece cada parte de mim. Suas mãos guiaram meu caminho, inspirando-me a perseverar em cada desafio.

Aos meus pais, Valquíria de Fátima Olegário de Almeida Moreira e Darley Boldrini (em memória), que foram minha base, força e as vozes de consolo nos momentos de saudade, mesmo com tantos quilômetros nos separando. Nunca conseguirei expressar suficientemente minha gratidão a vocês, que me deram esta oportunidade e sempre estiveram ao meu lado como meus maiores apoiadores. Apenas Deus conhece a imensidão do meu amor por vocês e a profundidade da minha saudade. Papai, este trabalho é dedicado a nós dois.

Aos meus irmãos, que sempre me encorajaram e acolheram-me com carinho, aos meus sobrinhos e afilhada, que são luz na minha vida, e ao meu avô, Nelson Olegário de Almeida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Andreotti, a quem admiro profundamente, por sua inestimável paciência, dedicação e compreensão. Andreotti desempenhou, além do papel de orientador, o papel de pai em inúmeros momentos, e sou imensamente grata pelas oportunidades que me proporcionou.

A todos integrantes da Equipe Andreotti, sem vocês não seria possível realizar este experimento e em especial a amiga e Dra. Viviane Cristina Modesto, aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE, pela colaboração.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira) e aos professores que muito me agregaram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que incentivou este trabalho com Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), que anteriormente era apenas voluntário.

Às minhas amigas, Beatriz B. Villela, Gabriela S. de Oliveira, Beatriz S. Freitas, Rayanne M. Ribeiro e Júlia C. Rondolfo. E a minha amiga e dupla de turma, Larissa de Carli Borges.

Por fim, expresso meu agradecimento à República Bola Gato e todas as moradoras com as quais tive o prazer de conviver. Vocês foram não apenas minha moradia, mas também minha segunda família em Ilha Solteira.

Com amor, meu muitíssimo obrigada.

Como disse David Icke: “O mundo é uma cidade pequena, seja gentil”. Então, expresso aqui meu carinho por quem esteve ao meu lado.

RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) do gênero *Azospirillum* estão relacionadas a produção de fitohormônios, atuando no aumento da altura de plantas e no crescimento radicular, enquanto as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, são capazes de fixar N₂ no ambiente da rizosfera, proporcionando alterações na morfologia e componentes de produção da soja. Além disso, visando o crescimento radicular e o possível incremento da nodulação e produtividade de grãos, tem sido utilizada a coinoculação de BPCVs. No entanto, esta prática pode levar à competição dessas bactérias na rizosfera, decorrendo efeitos antagônicos. Deste modo, torna-se necessário avaliar o efeito proporcionado pela inoculação ou coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja em áreas com histórico de inoculação ou não com *A. brasilense* nas gramíneas antecessoras da rotação de culturas. O experimento foi conduzido por dois anos seguidos na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão pertencente à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, localizada no município de Selvíria-MS, em área sob plantio direto há 16 e 17 anos, com solo classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico argiloso, em parcelas formadas por 14 linhas de 15,0 m de comprimento espaçadas com 0,45 m entrelinhas, distribuído em quatro tratamentos com seis repetições, utilizando delineamento de blocos ao acaso e esquema fatorial 2 x 2, inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, combinadas com áreas inoculadas ou não com *Azospirillum* *brasilense*. Avaliou-se o número e massa seca de nódulos por planta, além de componentes da produção e produtividade de grãos. O número de nódulos por planta foi maior tanto pelo histórico de inoculação da área, quanto pela coinoculação na soja, e este incremento no número de nódulos é comprovado pelo efeito hormonal da *Azospirillum* em aumentar o volume radicular e a infecção de rizóbios nas raízes. Entretanto, para aumentar a massa de nódulos deve haver a combinação de gramíneas antecessoras inoculadas e apenas *Bradyrhizobium* na soja. A coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* é conveniente quando houver histórico de inoculação de *Azospirillum* em gramíneas antecessoras a soja, pelo aumento do sistema radicular, número e massa de nódulos, e produtividade de grãos, sendo uma alternativa sustentável para o sistema de produção.

Palavras-chave: *Glycine max* L. Merril, *Avena strigosa*, simbiose, rizóbios, nodulação.

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) of the genus *Azospirillum* are related to the production of phytohormones, enhancing plant height and root growth, while bacteria of the genus *Bradyrhizobium* are capable of fixing N₂ in the rhizosphere, leading to changes in the morphology and production components of soybean. Additionally, to promote root growth and potentially increase nodulation and grain yield, coinoculation of PGPBs is being used. However, this practice can lead to competition between these bacteria in the rhizosphere, resulting in antagonistic rather than synergistic effects. Thus, it is necessary to evaluate the effects of inoculation or co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* on soybean crops in areas with or without a history of inoculation with *A. brasilense* in predecessor grass crops in the rotation system. The experiment was conducted for two consecutive years at the Teaching, Research, and Extension Farm belonging to the Faculty of Engineering of Ilha Solteira - UNESP, located in the municipality of Selvíria, Mato Grosso do Sul State, Brazil in a no-till area for 16 and 17 years, with soil classified as typical clayey Oxisol. Plots consisted of 14 rows, each 15.0 m long, spaced 0.45 m apart, distributed in four treatments with six replications, using a randomized block design and a 2 x 2 factorial scheme, inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*, combined with areas inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. The number and dry mass of nodules per plant, as well as grain yield components, were evaluated. The number of nodules per plant was higher due to both the historical inoculation of the area and the co-inoculation in soybean, and this increase in the number of nodules is attributed to the hormonal effect of *Azospirillum* in enhancing root volume and rhizobial infection in the roots. However, to increase the mass of nodules, there must be a combination of inoculated predecessor grasses and only *Bradyrhizobium* in soybeans. The co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* bacteria is beneficial when there is a history of *Azospirillum* inoculation in predecessor grasses to soybean, as it increases root system, number and mass of nodules, and grain yield, providing a sustainable alternative for the production system.

Key words: *Glycine max* L. Merrill, *Avena strigosa*, symbiosis, rhizobia, nodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Médias mensais para temperaturas mínima, média e máxima e precipitação pluvial durante a condução da cultura da soja nos anos safra - 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS.	8
Figura 2	- Croqui da área experimental.	9
Figura 3	Aveia preta, gramínea antecessora na rotação de cultura da soja. Selvíria-MS.	10
Figura 4	Adubação nos sulcos de semeadura e palhas secas cobrindo solo. Selvíria-MS.	12
Figura 5	Betoneira misturadora experimental. Selvíria-MS.	13
Figura 6	Parcelas demarcadas com carregadores. Selvíria-MS.	13
Figura 7	Mosca branca na face abaxial da folha de soja. Selvíria-MS.	14
Figura 8	Lagarta na folha de soja. Selvíria-MS.	14
Figura 9	Soja em estágio R1 (florescimento). Selvíria-MS.	16
Figura 10	Avaliação do índice de clorofila foliar com auxílio de clorofilômetro digital. Selvíria-MS.	16
Figura 11	Pesagem de massa seca de nódulos. Ilha Solteira-SP.	191 7
Figura 12	Hastes com vagens, pronta para colheita. Selvíria-MS.	18
Figura 13	Feixes agrupados para as avaliações. Selvíria-MS.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Análise de solo composta da área na profundidade 0 – 0,20 m no 1º ano de condução do experimento de soja. Selvíria-MS, 2020/2021.	11
Tabela 2	- Análise de solo da área nas profundidades 0 – 0,10; 0,10 – 0,20 e 0,20 – 0,40 m do 2º ano de condução do experimento de soja. Selvíria-MS, 2021/2022.	11
Tabela 3	- Teores foliares de N, P, K, Ca, Mg e S em função inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e da coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> , implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.	20
Tabela 4	- Índice de clorofila foliar (ICF) na cultura da soja, em função inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e da coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> , implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.	22
Tabela 5	- Médias para população final de plantas (PF), altura de plantas (AP) e de inserção da primeira vagem (AIPV) da soja, em função da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e da coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> , implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.	23
Tabela 6	- Médias para número de vagens (NVP), número de grãos por planta (NGP) e massa de 100 grãos (100) da soja, em função da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e da coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> , implantada em sistema plantio direto, em áreas inoculadas ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.	24
Tabela 7	- Desdobramento das interações significativas para número de vagens por planta (NVP). Selvíria-MS, 2021/2022.	25

Tabela 8	Médias para número de nódulos por planta (NNP), massa seca de nódulos por planta (MSNP) e produtividade de grãos (PG) de soja, em função da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e da coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> , implantada em sistema plantio direto, em áreas inoculadas ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.	26
Tabela 9	- Desdobramento das interações significativas para matéria seca de nódulos por planta (MSNP) nos anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2021/2022.	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITRÔGENIO NA CULTURA DA SOJA	3
2.2 SISTEMA PLANTIO DIRETO	4
2.3 <i>Bradyrhizobium</i> spp.	5
2.4 <i>Azospirillum</i> spp.	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO LOCAL	8
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	9
3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	10
3.4 AVALIAÇÕES REALIZADAS	15
3.4.1 Estado nutricional e índice de clorofila foliar	15
3.4.2 Número e massa de nódulos	15
3.4.3 COMPONENTES DE PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS	17
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS S	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max L. Merril*) é uma leguminosa de grande importância econômica e nutricional, amplamente cultivada em diversas regiões do mundo. Originária do leste da Ásia, sua domesticação e cultivo datam de mais de 3.000 anos atrás (EMBRAPA, 2024). A composição química e valor nutricional da soja garante diversidade de aplicações na nutrição humana e animal, desempenhando papel sócio econômico relevante para a agricultura (Komatsu *et al.*, 2010).

O Brasil, juntamente com os Estados Unidos e a Argentina, está entre os maiores produtores e exportadores de soja do mundo. Em 2022, a produção brasileira de soja alcançou 138 milhões de toneladas, consolidando o país como líder no mercado global (CONAB, 2022). A expansão da soja no Brasil está fortemente ligada ao desenvolvimento de novas tecnologias agrícolas, como práticas de manejo sustentável (MAPA, 2022).

A soja é uma planta herbácea, ereta, de ciclo anual, pertence à classe Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* (Moench) e, algumas características podem ser alteradas pelas condições ambientais (Chung; Singh, 2008; Dong *et al.*, 2004; Santos, 2008), e por essa capacidade de adaptação, confirma-se que a cultura possui ampla plasticidade. A plasticidade é a capacidade de se adaptar às condições ambientais e de manejo, por meio de modificações na morfologia da planta e nos componentes da produção agrícola (Komatsu *et al.*, 2010).

Assim como outras leguminosas proteicas, a soja necessita de grandes quantidades de nitrogênio (N). No entanto, apesar de o nitrogênio ser abundante na atmosfera na forma de N₂, ele não pode ser absorvido diretamente pela planta e precisa ser transformado em formas assimiláveis, como amônio e/ou nitrato. Segundo a literatura, existem três métodos de transformação: fixação biológica (FBN), industrial ou atmosférica (Prado, 2008).

Devido ao alto custo dos fertilizantes, países da América do Sul conduzem pesquisas de melhoramento com cultivares de soja e estirpes das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. O objetivo é analisar as condições nas quais o nitrogênio necessário pode ser fornecido às plantas via fixação biológica (FBN), resultando em vantagens econômicas e ambientais (Hungria, 2011).

Além do gênero *Bradyrhizobium*, o gênero de bactérias anteriormente denominadas diazotróficas como o *Azospirillum*, vem sendo utilizados como inoculante por vários lugares

pelo mundo (Hungria *et al.*, 2010). Além do efeito inoculante, observa-se que esse grupo de bactérias promove o crescimento das plantas devido à produção de fitohormônios.

No Brasil, a coinoculação com *Bradyrhizobium spp.* e *A. brasilense* na cultura da soja apresenta vantagens em relação a inoculação única com *Bradyrhizobium* em áreas previamente inoculadas e com população estabelecida de bradirizóbios da soja (Hungria *et al.*, 2013). Tal constatação é atribuída aos incrementos proporcionados pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal na produtividade da soja. Pesquisas realizadas no Brasil indicam melhorias no desempenho da cultura da soja devido ao aprimoramento do mecanismo de nodulação. Estudos recentes demonstraram que a adição de inoculantes contribui para aumentar o número de nódulos, fixação de N₂ e rendimento de grãos (Hungria *et al.*, 2015; Moretti *et al.*, 2018; Zago *et al.*, 2018).

No entanto, alguns resultados obtidos por pesquisadores a partir de combinações de microrganismos inoculantes em plantas leguminosas se mostram contraditórios, podendo tanto estimular, quanto inibir a formação de nódulos e crescimento de raízes, variando em função do nível de concentração do inóculo e forma de inoculação (Bárbaro *et al.*, 2008). Sendo necessário realizar mais experimentos de inoculação e coinoculação para entender melhor a performance das bactérias na cultura da soja nas condições brasileiras.

Assim, o objetivo principal do trabalho consistiu em avaliar o efeito da inoculação com a bactéria *Bradyrhizobium* e da coinoculação com as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja, implantada em SPD, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITRÓGENIO NA CULTURA DA SOJA

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo fundamental para a agricultura sustentável, especialmente no cultivo de leguminosas como a soja. A FBN envolve a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) por meio da ação de bactérias diazotróficas, beneficiando a planta hospedeira e reduzindo a necessidade de fertilizantes nitrogenados minerais (Baldani *et al.*, 2014).

Entre os elementos presentes na atmosfera o nitrogênio (N) é o mais abundante e o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. O balanço deste afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, visto que é um elemento essencial e impacta primeiramente o crescimento foliar (Ryle *et al.*, 1979; Taiz; Zeiger, 2003).

Portanto, uma fonte crucial de nitrogênio para as plantas é a fixação biológica do N_2 , um processo realizado por certos microrganismos, como algumas arqueobactérias e, principalmente, bactérias presentes no solo. Esses microrganismos contam com a enzima dinitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação do N_2 e convertê-lo em NH_3 . Conhecidas como diazotróficas ou fixadoras de N_2 , essas bactérias estabelecem associações com várias espécies de plantas, variando em grau de especificidade e sendo classificadas como associativas, endofíticas ou simbióticas. No caso da soja, a fixação biológica do N_2 ocorre principalmente através de uma relação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, em especial as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (Hungria *et al.*, 2007).

A simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, como as dos gêneros mencionados, é bem estabelecida. Essas bactérias formam nódulos nas raízes da planta, onde ocorre a fixação de nitrogênio. A utilização de inoculantes bacterianos é uma prática comum para garantir a eficiência desse processo, promovendo o crescimento saudável das plantas e aumentando a produtividade (Hungria *et al.*, 2017).

A introdução de bactérias do gênero *Azospirillum* também tem mostrado benefícios significativos. Essas bactérias, embora não formem nódulos, promovem o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios, aumento do volume radicular e da melhoria na absorção de nutrientes (Hungria *et al.*, 2018). A coinoculação de *Bradyrhizobium* e

Azospirillum na soja tem demonstrado resultados promissores, aumentando tanto a fixação de nitrogênio quanto o rendimento das colheitas (Hungria *et al.*, 2020).

2.2 SISTEMA PLANTIO DIRETO

O Sistema Plantio Direto (SPD) é uma técnica agrícola que tem ganhado destaque por seus benefícios ambientais e econômicos. Essa prática consiste em plantar as culturas diretamente sobre a palhada da colheita anterior, sem a necessidade de revolvimento do solo, sendo considerada uma técnica de cultivo conservacionista (Cruz *et al.*, 2009). Portanto, ajuda a preservar a estrutura do solo pela redução da erosão e aumento da retenção de água.

Segundo Hungria *et al.* (2015), o SPD promove a conservação do solo e da água, contribuindo para a sustentabilidade agrícola e a mitigação dos impactos das mudanças climáticas. Concordando com essa visão, Derpsch *et al.* (2014) afirmam que o SPD é crucial para a melhoria da resiliência dos sistemas agrícolas frente aos eventos climáticos extremos.

Considerando que o Cerrado brasileiro apresenta condições climáticas extremas além de solos com baixo teor de matéria orgânica, a sobrevivência dos rizóbios é baixa. A capacidade de fixação biológica do N₂ é afetada quando as bactérias são submetidas a condições de temperaturas elevadas e estresse hídrico, principalmente quando o solo está descoberto, podendo atingir temperaturas acima de 40°C nos primeiros 5 cm da camada superficial (Hungria *et al.*, 2007).

No SPD a cobertura com palhada aumenta o teor de matéria orgânica e a atividade biológica, favorecendo a formação de agregados estáveis e a infiltração de água. O aumento da biomassa microbiana no solo é um dos fatores chave para a eficiência do sistema, pois microrganismos desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na promoção do crescimento das plantas (Hungria *et al.*, 2009).

Friedrich e Kienzle (2020) também enfatizam que a prática contínua do SPD pode levar a uma maior estabilidade do solo e melhoria na sua capacidade de retenção de água, resultando em uma menor necessidade de irrigação. O plantio direto quanto comparado ao plantio convencional propicia aumento do número de células de *Bradyrhizobium* e torna mais eficiente a capacidade das estirpes de fixar N₂ (Hungria *et al.*, 1997).

2.3 *Bradyrhizobium* spp.

As espécies de *Bradyrhizobium* são amplamente empregadas na inoculação de soja devido à sua alta eficácia na FBN. Pesquisas recentes sublinham a relevância da seleção de estirpes específicas adaptadas às diferentes condições de solo e clima, objetivando maximizar os benefícios da FBN (Hungria; Nogueira; Araújo, 2020). A utilização de estirpes nativas e bem adaptadas tem mostrado eficácia em aumentar a produtividade e a sustentabilidade do cultivo de soja no Brasil (Santos *et al.*, 2019).

Entre os microrganismos fixadores de nitrogênio, destacam-se os rizóbios, bactérias que estabelecem simbiose com plantas leguminosas. Essa relação é a principal fonte de nitrogênio biologicamente fixado em sistemas agrícolas (Graham e Vance, 2003). A simbiose entre leguminosas e rizóbios é particularmente eficiente devido à coevolução entre os simbiossantes (Moreira e Siqueira, 2006).

Inicialmente, os rizóbios foram agrupados no gênero *Rhizobium* (Frank, 1889; Kuykendall *et al.*, 1992). Contudo, Jordan (1982) propôs uma separação taxonômica, distinguindo rizóbios de crescimento rápido (*Rhizobium*) dos de crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

A introdução da FBN foi um dos principais fatores para o cultivo em larga escala da soja no Brasil. As bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, ao entrarem em contato com o sistema radicular, formam nódulos nas raízes, onde ocorre a fixação do N₂ atmosférico em troca de fotoassimilados fornecidos pelas plantas, estabelecendo uma relação benéfica para ambos (Silva *et al.*, 2011; Zuffo, 2016).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir nodulação em leguminosas tanto tropicais quanto temperadas (Holt *et al.*, 1994; Somasegaran e Hoben, 1994). Sua eficiência permite altos rendimentos de grãos sem necessidade de nitrogênio mineral, prevenindo efeitos ambientais negativos, como lixiviação e desnitrificação (Alves *et al.*, 2003; EMBRAPA, 2001). Estudos recentes continuam a confirmar a eficácia das estirpes de *Bradyrhizobium* em diversas condições ambientais e culturas (Rodrigues *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Recentemente, novas abordagens no uso de *Bradyrhizobium* têm sido exploradas para aprimorar a fixação de nitrogênio. Estudos indicam que a coinoculação com outras bactérias promotoras de crescimento pode potencializar os benefícios da FBN em condições de estresse ambiental, como seca e salinidade (Oliveira *et al.*, 2022). Além disso, pesquisas têm focado na

identificação de genes específicos que regulam a nodulação e a eficiência da FBN, visando o desenvolvimento de estirpes geneticamente melhoradas (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2023).

2.4 *Azospirillum* spp.

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm ganhado destaque em pesquisas devido ao seu papel como promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Elas colonizam o sistema radicular das plantas, produzindo fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, que promovem o desenvolvimento das raízes e aumentam a absorção de nutrientes (HUNGRIA *et al.*, 2018). A prática de coinoculação com *Azospirillum* tem mostrado resultados positivos em várias culturas, incluindo soja (Hungria; Mendes; Reis Junior, 2020).

O solo é um ecossistema com grande diversidade de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), que podem ser de vida livre ou associadas às raízes das plantas (ZUFFO, 2016). Assim, RPCPs são quaisquer bactérias que promovem o crescimento vegetal, excluindo rizóbios que têm uma relação simbiótica com plantas (Silveira e Freitas, 2007). Neste sentido, Bashan e Holguin (1998) revisaram o termo “rizobactérias” para “bactérias”, substituindo RPCP por BPCP para simplificar a nomenclatura.

As *Azospirillum* spp. ganharam notoriedade na década de 1970, graças aos trabalhos da pesquisadora Johanna Döbereiner, que descobriu sua capacidade de fixar nitrogênio em associação com gramíneas (Döbereiner e Day, 1976; Döbereiner *et al.*, 1976). Além desta, a *Azospirillum* oferece outras vantagens, incluindo antagonismo a patógenos, produção de fitormônios e resistência a variações de temperatura, além de ocorrer em diversos tipos de solo e clima (Araújo, 2008).

Estudos destacam que a inoculação com *Azospirillum* aumenta o teor de clorofila, melhora parâmetros fotossintéticos e fisiológicos das plantas, como condutância estomática e potencial hídrico, resultando em maior altura das plantas e fitomassa (Barassi *et al.*, 2008). Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera das gramíneas, a *Azospirillum d* é amplamente estudada devido à sua distribuição em solos tropicais e subtropicais. Seu uso tem sido demonstrado como eficaz para estimular o crescimento vegetal, aumentar a produtividade e as concentrações de nitrogênio em várias culturas de interesse agrícola (Reis *et al.*, 2000; Hartmann e Baldani, 2006; Hungria *et al.*, 2021).

O uso de *Azospirillum brasilense* contribui para o aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, biomassa, altura das plantas e aceleração da germinação, além de beneficiar o sistema

radicular, resultando em maior produtividade de matéria seca e grãos (Dalla Santa *et al.*, 2004; Hungria *et al.*, 2010; Vogel *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2022).

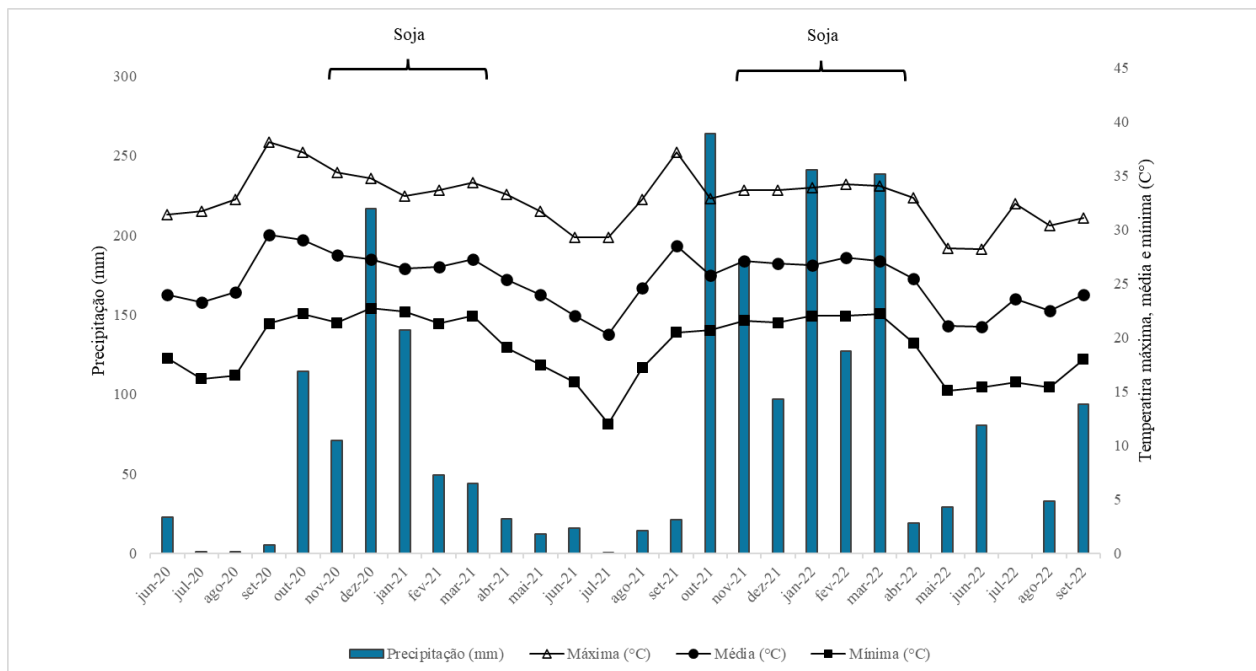
Pesquisas têm explorado a coinoculação de *Azospirillum* com outras bactérias promotoras de crescimento para melhorar a resiliência das plantas ao estresse abiótico, como seca e salinidade (Cassán *et al.*, 2021). Além disso, estudos sobre a manipulação genética de *Azospirillum* buscam aumentar a produção de fitohormônios e a eficiência na fixação de nitrogênio, com o objetivo de desenvolver estirpes mais eficazes para diferentes condições agrícolas (Carvalho *et al.*, 2023).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO LOCAL

O trabalho foi realizado durante os períodos dos anos safra de 2020/21 e 2021/22, ambos na mesma área experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão pertencente à Faculdade de Engenharia – UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria – MS. As coordenadas geográficas são de aproximadamente 20° 34' de latitude S, 51° 40' de longitude O e 361m de altitude. Durante a condução da cultura foram obtidas as temperaturas mínima, média e máxima e a precipitação pluvial em estação meteorológica próxima à área de condução da pesquisa (Figura 1).

Figura 1. Médias mensais para temperaturas mínima, média e máxima e precipitação pluvial durante a condução da cultura da soja nos anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS.

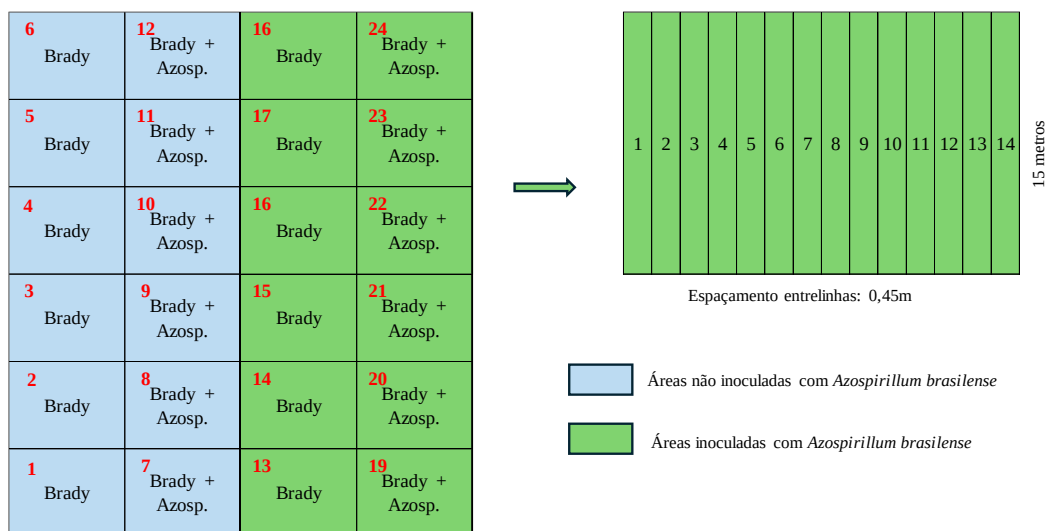


Fonte: clima FEIS, 2024.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental deu-se em blocos ao acaso, com 6 repetições, e parcelas constituídas por 14 linhas de 15 m de comprimento, espaçadas a 0,45 m entrelinhas, em esquema fatorial 2 x 2, ou seja, soja inoculada ou co-inoculada com *B. japonicum* e/ou *A. brasilense* nas áreas da cultura da aveia preta (*Avena strigosa*) antecessora, inoculadas ou não com *A. brasilense* (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Croqui da área experimental.



Fonte: autora, 2024.

Figura 3 – Aveia preta, gramínea antecessora na rotação de cultura da soja. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2021.

2.6 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

As semeaduras da soja dos experimentos foram realizadas, respectivamente, em 19 de novembro de 2020 e em 8 de novembro de 2021, em LATOSSOLO VERMELHO Distrófico (Santos *et al.*, 2018) sob plantio direto há 16 anos e posteriormente 17 anos, cuja análises parciais da fertilidade (Raij *et al.*, 2001) constam, respectivamente nas Tabelas 1 e 2. Utilizou-se sementes de soja inoculadas ou coinoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal na semeadura conforme os tratamentos.

Os tratamentos foram constituídos de forma a avaliar as interações entre os fatores, sendo eles a inoculação com a *Bradyrhizobium japonicum* ou a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense*, e o histórico de inoculação com *Azospirillum brasilense* das áreas das gramíneas antecessoras, neste caso a aveia preta, uma das principais plantas de cobertura no Estado de São Paulo e importante reserva de nutrientes às culturas de verão (Crusciol, 2008).

Tabela 1. Análise de solo composta da área na profundidade 0 – 0,20 m no 1º ano de condução do experimento de soja. Selvíria-MS, 2020/2021.

Profundidade (m)	P - resina	MO	pH	V	m	Zn
	mg dm⁻³	g dm⁻³	CaCl₂	%	%	mg dm⁻³
0 – 0,20	43	28	4,8	49	4	2,1

P – resina (fósforo resina), MO (matéria orgânica), pH (potencial hidrogeniônico), V (saturação por bases), m (saturação por alumínio) e Zn (teor de zinco no solo).

Tabela 2. Análise de solo da área nas profundidades 0 – 0,10; 0,10 – 0,20 e 0,20 – 0,40 m do 2º ano de condução do experimento de soja. Selvíria-MS, 2021/2022.

Profundidades (m)	P - resina	MO	pH	V	m	Zn
	mg dm⁻³	g dm⁻³	CaCl₂	%	%	mg dm⁻³
0 – 0,20	50	38	4,7	33	17	0,9

P – resina (fósforo resina), MO (matéria orgânica), pH (potencial hidrogeniônico), V (saturação por bases), m (saturação por alumínio) e Zn (teor de zinco no solo).

Na adubação nos sulcos de semeadura (Figura 4) foram aplicados 370 kg ha⁻¹ do formulado 08-28-16 em ambos os anos de cultivo. As sementes de soja foram inoculadas à sombra, com auxílio de betoneira (Figura 5), com *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe SEMIA 5079 - 5x10⁹ UFC/g, na dose de 100 g para 40 kg de sementes) na formulação turfosa e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* (estirpes AbV5 e AbV6 - 9x10⁸ UFC/mL, na dose de 200 mL para 20 kg de sementes).

Durante a condução do experimento (Figura 6) foram feitos carregadores para facilitar o acesso e para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas foram feitas as devidas aplicações de defensivos, de acordo com a necessidade da cultura, em ambos os anos de condução da soja.

Figura 4 – Adubação nos sulcos de semeadura e palhas secas cobrindo solo. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2021

No primeiro ano safra, em 26 de novembro de 2020 foi realizada a aplicação do herbicida com ingrediente ativo glifosato na concentração de $1,5 \text{ kg ha}^{-1}$ e 30g de clorimurom-etílico para controlar a rebrota da aveia preta na área. Dois dias depois, em 28 de novembro de 2020 foi feita aplicação de dois inseticidas, sendo os ingredientes ativos metomil e triflurmeto, nas respectivas concentrações, 700 mL ha^{-1} e 120 mL ha^{-1} . A última aplicação do ano de 2020 foi feita em 17 de dezembro, utilizou-se acefato na concentração de 750 g kg^{-1} para controle dos percevejos na área. Em 12 de janeiro de 2021 foi feita aplicação de inseticida tiametoxam 141 g L^{-1} e lambda-cialotrina 106 g L^{-1} e beta-ciflutrina 125 g L^{-1} . A última aplicação do experimento de 2020/2021 foi de inseticida com ingredientes Tiametoxam 141 g L^{-1} e Lambda-Cialotrina 106 g L^{-1} para o controle de mosca-branca e lagartas (Figuras 7 e 8).

Figura 5 – Betoneira misturadora experimental. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2021

Figura 6 – Parcelas demarcadas com carreadores. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2021.

Em 02 de janeiro de 2022, já no segundo ano safra, foi realizada sobre a soja a aplicação de inseticida com ingrediente ativo o acefato, na concentração 750 g kg^{-1} e herbicida glifosato, na concentração 620 g L^{-1} , e em 12 de janeiro de 2022 foram aplicados 600 mL de fungicida

com ingredientes ativos os trifloxistrobina 100 g L⁻¹ e tebuconazol 200 g L⁻¹ + 200 mL de inseticida tiametoxam 141 g L⁻¹ e lambda-cialotrina 106 g L⁻¹ + 250 mL de acetamiprido 200 g L⁻¹ e piriproxifem 100 g L⁻¹. A última aplicação foi de inseticida, em 26 de janeiro de 2022, com ingrediente ativo o acefato na concentração 750 g kg⁻¹ para o controle de lagartas.

Figura 7 – Mosca branca na face abaxial da folha de soja. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2022.

Figura 8 – Lagarta na folha de soja. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2022.

2.7 AVALIAÇÕES REALIZADAS

2.7.1 Estado nutricional e índice de clorofila foliar

No estágio R1 da soja (início do florescimento) (Figura 9), foram coletados 20 trifólios por parcela (3º trifólio desenvolvido a partir do ápice da planta, devido ao cultivar ser de hábito de crescimento indeterminado), e o material coletado foi colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h. Após secagem, o material foi moído em moinho tipo Willey, com armazenamento do material obtido em saquinhos plásticos, devidamente identificados. Deste material foram determinados os teores de N, P, K, Ca, Mg e S segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997). Ainda, em estágio R1, foram feitas as leituras do índice de clorofila foliar (ICF) com o auxílio do clorofilômetro digital (FALKER) em dez folhas por parcela (Figura 10), usando para leitura o 3º trifólio desenvolvido a partir do ápice da planta.

2.7.2 Número e massa de nódulos

As avaliações de número e massa de nódulos por planta foram feitas no estágio R4 da soja, nos dias 06 de fevereiro de 2021 (primeiro ano experimental) e 22 de janeiro de 2022 (segundo ano experimental). Com auxílio de uma pá e de uma enxada, foram coletadas as raízes de três plantas consecutivas em linha por parcela, em sequência, foram lavadas em água corrente com o intuito de remover o solo aderido. Os nódulos foram destacados para a contagem do número por planta e pesagem para determinação da massa fresca de nódulos. Por fim, estes foram submetidos a secagem em estufa por 48 horas à 65 °C e pesados para determinar a massa seca de nódulos por planta (Figura 10).

Figura 9 – Soja em estágio R1 (florescimento). Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2021.

Figura 10 – Avaliação do índice de clorofila foliar com auxílio de clorofilômetro digital. Selvíria-MS



Fonte: autora, 2020.

Figura 11 – Pesagem de massa seca de nódulos. Selvíria-MS



Fonte: autora, 2022.

2.7.3 COMPONENTES DA PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS

Após as coletas e avaliações de folhas e nódulos, as plantas de soja desfolharam naturalmente (Figura 11) e foram feitas avaliações no estágio R8, ocasião da colheita em 27 de fevereiro de 2021 (primeiro ano experimental) e 08 de março de 2022 (segundo ano experimental). Foram montados dois feixes de coleta de plantas de soja, sendo um deles da coleta de 10 plantas sequenciais em linha para a avaliação de altura da altura de plantas e da altura de inserção da primeira vagem; e outro feixe com todas as plantas de soja nas 3 linhas centrais com 6 metros de comprimento (desprezando as linhas laterais como bordadura), para as demais avaliações (Figura 12):

- Altura de planta: com o auxílio de uma trena métrica foi aferido a altura das plantas da base ao ápice;
- Altura de inserção da primeira vagem: com o auxílio de uma trena métrica foi medida a base até a primeira vagem;

- População de plantas: contando todas as plantas nas 3 linhas centrais de 6 m e convertendo para hectare;
- Número de vagens por planta: foram contadas as vagens das 10 plantas coletadas e determinado o número pela relação do número total de vagens/número de plantas;
- Número de grãos por vagem: a partir do número de vagens contabilizado nas 10 plantas, foi calculado a relação número total de grãos/número total de vagens;
- Massa de 100 grãos: foi avaliado pela contagem de 100 grãos (3 amostras), em cada parcela, com posterior pesagem em balança de precisão e corrigidas para 13% de umidade (base úmida);
- Produtividade de grãos: As plantas da área útil de cada parcela foram arrancadas e deixadas para secagem, com posterior trilha mecânica, pesou-se os grãos e os dados foram transformados em kg ha^{-1} (13 % base úmida);

Figura 12 – Hastes com vagens, pronta para colheita. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2022.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados obtidos a partir das avaliações foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste t (Student) a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR® (Ferreira, 2011).

Figura 13 – Feixes agrupados para as avaliações. Selvíria-MS.



Fonte: autora, 2022.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nutrição das plantas na área experimental foi adequada (Tabela 3) nos dois anos consecutivos do experimento de soja com bactérias promotoras de crescimento, muito em função do histórico de SPD. Na análise do teor nutricional foliar, segundo Ambrosano *et al.* (1997), os teores de N, P, K, Ca, Mg e S estão dentro da faixa adequada de suficiência, mesmo em solo ácido e com baixos índices de fertilidade (Tabela 1 e 2).

Tabela 3. Teores foliares de N, P, K, Ca, Mg e S em função inoculação com *Bradyrhizobium* e da coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.

Tratamentos	N		P		K		Ca		Mg		S	
	-----g kg ⁻¹ -----											
Área	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Sem inoculação	47	50	3,1	3,1b	25,4	17	8,5	4,9	5,3	4,5	2,1	3,2
Com inoculação	45	51	3,1	3,3a	27,6	18	8,8	5,3	5,7	4,8	2,3	3,1
Inoculação												
Brady.	47	52	3,4	3,2	25,7	18	8,5	5,0	5,6	4,6	1,9	3,2
Brady. + Azosp.	45	50	2,9	3,1	25,6	16	8,4	5,2	5,2	4,8	2,1	3,1
Teste F												
Área	0,27	0,67	1,61	0,02*	0,12	0,14	0,22	0,55	0,11	0,31	0,28	0,50
Inoculação	1,06	0,09	0,11	0,36	1,23	0,18	0,12	0,60	0,98	0,58	0,03	0,42
A x I	1,89	0,35	3,62	0,67	0,10	0,50	0,27	0,55	0,59	0,71	0,50	0,36
CV (%)	4,67	5,2	4,04	7,5	9,25	13,3	17,1	21,2	15,3	17,9	13,0	11,9

**, * e ns: significativo ao nível de 1%, ao nível de 5% e não significativo pelo teste F, respectivamente. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*). *Médias seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste t (Student)

Quanto a análise de solo da área, alguns pontos importantes devem ser destacados. No primeiro ano experimental, a análise composta de 0-0,20 m de profundidade (Tabela 1), apresenta teor de fósforo, pouco móvel no solo, menor que a soma dos teores de fósforo das duas primeiras camadas do segundo ano experimental, apesar de concentrado na camada superficial (Tabela 2), é notório que há mais presença do nutriente no segundo ano agrícola do trabalho, justificado pela decomposição da matéria orgânica.

O teor de matéria orgânica no solo, por sua vez, expressa que a palhada e o plantio direto na área propiciaram que mesmo nas camadas mais profundas, houve lixiviação da M.O, que é

mais abundante na camada superficial do solo devido à deposição de resíduos vegetais e à intensa atividade microbiana (Brugnara, 2020).

O pH do solo apresenta caráter levemente ácido, segundo Melo *et al.* (2009), solos do cerrado brasileiro são naturalmente ácidos devido à intensa lixiviação de bases (cálcio, magnésio, potássio) causada pelas chuvas e pela elevada atividade microbiana que aumenta a liberação de ácidos orgânicos, esta acidez influencia a disponibilidade de nutrientes essenciais, necessitando correções, como a calagem, além disso, no presente trabalho, muito provavelmente, a acidez se dá devido à decomposição da palhada pelo histórico de SPD.

As saturações por bases não se encontram satisfatórias para a cultura da soja, de acordo com Novais *et al.* (2007), "a saturação por bases ideal para solos agrícolas deve ser superior a 50%", caso contrário se fez necessário aplicar doses consideráveis de calcário nas culturas seguintes. A saturação por alumínio no primeiro ano agrícola do presente trabalho apresentou-se ideal para minimização dos efeitos tóxicos do alumínio nas plantas e no desenvolvimento da cultura, abaixo de 10% de saturação por alumínio é possível evitar toxicidade e garantir a saúde do solo e das plantas (Cantarella, 2007), por outro lado, no segundo ano agrícola os teores de saturação por alumínio encontram-se altos em todas as camadas analisadas, indicando a necessidade de calagem, isso porque solos com elevadas porcentagens de saturação por alumínio proporcionam limitações no desenvolvimento das plantas e na produtividade de grãos, além de participar da troca catiônica efetiva (Brandão *et al.* 2021) .

Quanto aos teores de P nas plantas, embora dentro da faixa adequada nos dois anos experimentais (Tabela 3), segundo Ambrosano *et al.* (1997), foram superiores nas áreas onde as gramíneas antecessoras à cultura da soja foram inoculadas por *Azospirillum brasilense*. Esse acréscimo no teor de P pode ser justificado pelo efeito hormonal que a bactéria manifesta em incrementar o crescimento radicular, o que proporciona mais pelos radiculares, consequentemente, maior exploração das raízes no solo (Barassi *et al.*, 2008) e absorção de nutrientes pouco móveis como o P. Para os demais nutrientes analisados, não foi observado diferença significativa para os tratamentos testados.

Tabela 4. Índice de clorofila foliar (ICF) na cultura da soja, em função inoculação com *Bradyrhizobium* e da coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.

ICF	Ano	
	1º	2º
Área		
Sem inoculação	39	36
Com inoculação	40	36
Inoculação		
<i>Brady.</i>	39	35b
<i>Brady.</i> + <i>Azosp.</i>	40	37a
Teste F		
Área	0,08	0,67
Inoculação	0,23	0,04*
A x I	0,23	0,90
CV (%)		
	5,3	5,1

**, * e ns: significativo ao nível de 1%, ao nível de 5% e não significativo pelo teste F, respectivamente. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*). *Médias seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste t (Student)

O nitrogênio no presente trabalho apresenta-se em teores adequados, o que proporcionou maior índice de clorofila foliar (ICF), visto que este nutriente está correlacionado ao índice na cultura da soja (Araújo Jnuir, 2018). Neste caso, nota-se que no segundo ano agrícola houve significância no ICF quando realizada a coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* (Tabela 4). A ascendência do índice na coinoculação em relação a inoculação do *Rhizobium* pode ser provado pela capacidade do *Azospirillum* de produzir fitohormônios e promover o aumento da estatura de plantas, que interfere no ICF através da maior nodulação e fixação de N₂ (Hungria, 2013).

Para população final de plantas (PF) houve efeito da coinoculação das bactérias nas sementes no primeiro ano agrícola (Tabela 5), apresentando um incremento no número de plantas, pois segundo Hungria et al. (2007), a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* pode aumentar a taxa de germinação ao melhorar a disponibilidade de nutrientes e estimular o crescimento inicial.

Tabela 5. Médias para população final de plantas (PF), altura de plantas (AP) e de inserção da primeira vagem (AIPV) da soja, em função da inoculação com *Bradyrhizobium* e da coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, implantada em sistema plantio direto de 16 e 17 anos, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.

Tratamentos	PF (plantas ha ⁻¹)		AP (cm)		AIPV (cm)	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Área						
Sem inoculação	242.991	220.576	122	87	17,4	21,9
Com inoculação	248.714	226.543	121	87	17,7	21,6
Inoculação						
<i>Brady.</i>	239.280b	222.839	123	88	17,3	22,3
<i>Brady.</i> + <i>Azosp.</i>	252.425a	224.279	120	86	17,8	21,1
Teste F						
Área	0,820 ^{ns}	0,60	0,61	0,86	0,14	0,79
Inoculação	4,327*	0,89	2,12	0,36	0,31	0,31
A x I	0,004	0,19	1,73	0,78	0,05	0,58
CV(%)	6,3	12,1	3,8	4,7	11,8	12,5

**, * e ns: significativo ao nível de 1%, ao nível de 5% e não significativo pelo teste F, respectivamente. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*).

Para altura de plantas (AP) e de inserção da primeira vagem (AIPV) de soja, em ambos os anos agrícolas, bem como a PF para o segundo (Tabela 5), os tratamentos foram semelhantes entre si, portanto não houve limitação para a emergência e desenvolvimento do número de plantas desejado, entretanto, pela característica hídrica (Figura 1) dos anos é notório que a média das estaturas das plantas são diferentes entre o primeiro e o segundo ano, sendo no

primeiro ano plantas com estaturas mais altas, e no segundo ano abaixo das características da cultivar de crescimento indeterminado (acima de 1,0 m de altura).

Durante o ano safra 2021/2022 (Gráfico 1), a disponibilidade hídrica para o experimento foi limitada principalmente na fase de enchimento de grãos (V3 ao V5). Deste modo, a falta de disponibilidade hídrica, proporcionou grãos de soja menores, consequentemente interferindo na massa de cem grãos (M100) e resultando em menor produtividade de grãos (Tabelas 6 e 8).

Tabela 6. Médias para número de vagens (NVP) e de grãos por planta (NGP) e massa de 100 grãos (100) da soja, em função da inoculação com *Bradyrhizobium* e da coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, implantada em sistema plantio direto, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.

Tratamentos	NVP		NGP		M100	
	(nº planta ⁻¹)		(g planta ⁻¹)		(g)	
Área	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Sem inoculação	46	55b	111	135b	14,8	16,1
Com inoculação	43	61a	107	154a	14,3	15,9
Inoculação						
<i>Brady.</i>	46	63a	111	157a	14,6	16,2
<i>Brady.</i> + <i>Azosp.</i>	43	54b	108	132b	14,6	15,8
Teste F						
Área	1,770 ^{ns}	0,027*	0,368 ^{ns}	0,006**	3,752 ^{ns}	0,638 ^{ns}
Inoculação	1,309 ^{ns}	0,001**	0,193 ^{ns}	0,001**	0,001 ^{ns}	0,441 ^{ns}
Área x Inoculação	1,84 ^{ns}	0,033**	0,153 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,318 ^{ns}	0,969 ^{ns}
CV (%)	12,3	10,3	15,6	10,9	4,2	7,7

**, * e ns: significativo ao nível de 1%, ao nível de 5% e não significativo pelo teste F, respectivamente. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*).

De acordo com Braccini *et al.* (2016), tratamentos com inoculação de sementes com *B. japonicum*, na formulação turfosa ou líquida, ou então, associada com diferentes doses de *Azospirillum brasilense*, incrementaram o número de nódulos e no peso de nódulos (Tabela 8)

quando comparado com os tratamentos em que não foi realizada a inoculação, ainda que no presente trabalho não tenha sido utilizado as formas líquidas do inoculante.

É possível notar que a inoculação da gramínea antecessora com estirpes de *Azospirillum brasilense* proporcionou incremento nos componentes de produtividade da soja, NVP e NGP no segundo ano (Tabela 6), de modo similar ao obtido por Santos (2021) em teste de diferentes cultivares de soja.

No ano safra de 2021/22, a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, proporcionou redução do NVP e NGP, o que caracteriza certo efeito de competição na rizosfera, visto que ambas foram inoculadas via sementes no mesmo momento. Assim, a prática de colocar *Bradyrhizobium* via sementes e *Azospirillum brasilense*, via sulco de semeadura, precisa ser estudada para averiguar se há efeito antagônico.

No desdobramento da interação histórico de inoculação da área x com ou sem a coinoculação nas sementes, para número de vagens por planta (NVP), para o segundo ano agrícola (Tabela 7) verifica-se que a maior resposta confere aos tratamentos em que as sementes foram apenas inoculadas com *Bradyrhizobium* em áreas com histórico de inoculação com *Azospirillum brasilense*. Isso acontece porque pode haver competição entre *Azospirillum* e *Bradyrhizobium*, quando inoculadas juntas nas sementes, afetando a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, embora ambas possam atuar sinergicamente em certas condições (HUNGRIA *et al.*, 2007).

Tabela 7. Desdobramento das interações significativas para número de vagens por planta (NVP). Selvíria-MS, 2021/2022.

Inoculação	Área	
	Sem inoculação	Com inoculação
<i>Brady.</i>	62,70aA	62,9aA
<i>Brady.</i> + <i>Azosp.</i>	47,7bB	59,0bA

Médias seguidas de letras distintas minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si, pelo teste de t a 5% de probabilidade. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*).

A rotação de culturas consiste em alternar espécies vegetais no decorrer do tempo em uma mesma área, resultando na incorporação de massa verde no solo e comumente se utilizam

culturas com sistemas radiculares distintos, de modo que cada espécie forneça um efeito residual de BPCVs positivo para o solo ou para a cultura sucessora (FINKLER, 2018).

Assim, as áreas que não haviam sido inoculadas com *Azospirillum* na gramínea antecessora na rotação de cultura, não apresentam diferença significativa quanto a inoculação com *Bradyrhizobium* e a coinoculação com *Azospirillum brasilense*, o que demonstra a possível competição entre as bactérias quando inoculadas conjuntamente nas sementes.

Tabela 8. Médias para número de nódulos por planta (NNP), massa seca de nódulos por planta (MSNP) e produtividade de grãos (PG) de soja, em função da inoculação com *Bradyrhizobium* e da coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*, implantada em sistema plantio direto, em áreas inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* nas gramíneas antecessoras durante os anos safra 2020/2021 (1º) e 2021/2022 (2º). Selvíria-MS, 2022.

Tratamentos	NNP		MSNP		PG	
	(nº planta ⁻¹)		(g planta ⁻¹)		(kg ha ⁻¹)	
Área	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Sem inoculação	35	36b	0,678	0,992	5.289	3.335b
Com inoculação	35	45a	0,888	1,583	5.218	3.895a
Inoculação						
<i>Brady.</i>	35	35b	0,563	1,416	5.036	3.698
<i>Brady.</i> + <i>Azosp.</i>	35	47a	1,002	1,158	5.472	3.535
Teste F						
Área	0,007 ^{ns}	0,032*	0,288 ^{ns}	0,0002**	0,220 ^{ns}	0,0006**
Inoculação	0,021 ^{ns}	0,935*	0,0001**	0,724 ^{ns}	0,331 ^{ns}	0,101 ^{ns}
Área x Inoculação	0,041 ^{ns}	0,119 ^{ns}	0,044*	0,0004**	0,226 ^{ns}	0,251 ^{ns}
CV (%)	20,1	28,9	36,3	37,4	11,7	10,6

**, * e ns: significativo ao nível de 1%, ao nível de 5% e não significativo pelo teste F, respectivamente. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady.* + *Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*).

Por outro lado, em áreas que já haviam tido gramíneas inoculadas, quando inseridas as duas bactérias promotores de crescimento vegetal, parece haver efeito aditivo, havendo

aumento do número e da massa seca de nódulos devido ao aumento dos pelos radiculares (Tabela 8).

No que se refere a inoculação ou não apenas com a bactérias simbióticas, Galindo *et al.* (2017), verificaram aumento na produtividade de grãos de soja com a coinoculação com *A. brasilense*, quando inoculadas as sementes de soja. No atual trabalho, há diferença significativa de produtividade de grãos nas áreas anteriormente inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Tabela 8), sendo que esta diferença poderia ter sido ainda maior caso não houvesse ocorrido a falta de água durante o enchimento de grãos (Figura 1).

No desdobramento da interação histórico de inoculação da área x com ou sem a coinoculação nas sementes, para massa de nódulos por planta (MSNP) (Tabela 9), é possível notar que a melhor interação se dá quando há histórico de inoculação das gramíneas antecessoras com *Azospirillum* nas áreas para soja em sucessão.

Tabela 9. Desdobramento das interações significativas para matéria seca de nódulos por planta (MSNP) nos anos safra 2020/2021 e 2021/2022. Selvíria-MS, 2021/2022.

Inoculação	Área			
	Sem inoculação		Com inoculação	
	1°	2°	1°	2°
Brady.	0,060aA	0,800 aB	0,521aA	2,033 aA
Brady. + Azosp.	0,750aB	1,183 aA	1,256aA	1,133 bA

Médias seguidas de letras distintas minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si, pelo teste de t a 5% de probabilidade. *Azosp.* (*Azospirillum brasilense*); *Brady.* (*Bradyrhizobium*); *Brady. + Azosp.* (coinoculação com as bactérias *A. brasilense* e *B. japonicum*).

5. CONCLUSÃO

Durante o ano agrícola 2020/2021 em detrimento da distribuição pluviométrica, a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* nas sementes de soja não interferiram na produtividade de grãos, embora, a combinação áreas inoculadas das gramíneas antecessoras com coinoculação na soja tenham aumentado a massa seca de nódulos.

No ano agrícola de 2021/2022 a coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* combinada com histórico de inoculação de *Azospirillum* em gramíneas antecessoras a soja promoveu o aumento do número e massa de nódulos, e produtividade de grãos, logo, a coinoculação é conveniente quando houver histórico de inoculação de *Azospirillum* na área em que a soja for semeada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B. J. R. et al. Fixação biológica do nitrogênio e produtividade de grãos. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Eds.). **Fixação biológica do nitrogênio**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 437-447.
- AMBROSANO, E. J.; TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. Leguminosas e oleaginosas. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C., eds. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1997. 285 p. (Boletim técnico, 100).
- ARAÚJO JUNIOR, O. **Soja em sucessão ao capim marandu: efeito do *Azospirillum* associado ao *Bradyrhizobium***. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, 2018.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. A importância das bactérias diazotróficas na agricultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 315-324, 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000600001.
- BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. **Técnica alternativa: coinoculação se soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade**. Texto em hipertexto. Infobios, 2008.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. A critical review of the different mechanisms of plant growth promotion by bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 10, p. 199-215, 1998.
- BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; LIMA, L. H. S.; PICCININ, G. G. Coinoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016. <https://doi.org/10.18188/sap.v15i1.10565>.
- BRANDÃO, D. S. et al. **Química e Fertilidade do Solo**. Porto Alegre: GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. SAGAH, 2021.
- CARVALHO, T. L. G. et al. Advances in the genetic manipulation of *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 451-465, 2023.
- CASSÁN, F. et al. Coinoculação de *Azospirillum* e outras bactérias promotoras de crescimento. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 377-387, 2021.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento safra brasileira grãos**, v. 9 – Safra 2021/2022, n. 12 – Décimo levantamento, Brasília, p. 1-88, setembro 2022.
- CRUSCIOL, C. A. C. et al. Taxas de decomposição e de liberação de macronutrientes da palhada de aveia preta em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 481-489, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000200024>.

- DALLA SANTA, O. R. et al. Efeitos de *Azospirillum* na produtividade de culturas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 137-144, 2004.
- DERPSCH, R.; FRIEDRICH, T.; KASSAM, A.; HONGWEN, L. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 7, n. 4, p. 1-25, 2014.
- DÖBEREINER, J. et al. Studies on the Nitrogen-Fixing Activity in the Root Region of Maize (*Zea mays*) and Other Grasses. In: NEWTON, W. E.; NAYLOR, A. W. (Eds.). **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**. Baltimore: University Park Press, 1976. p. 518-538.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NAYLOR, A. W. (Eds.). **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**. Baltimore: University Park Press, 1976. p. 518-538.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Impacto ambiental do uso de *Bradyrhizobium***. Boletim Técnico, n. 16, p. 1-24, 2001.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Soja no Brasil: Histórico e Perspectivas**. 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/historico>.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FINKLER, R.; PEDROSO, R. M.; STEIN, R. T.; LAZZARINI, P. R. C. **Ciências do solo e fertilidade**. Porto Alegre: GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. SAGAH, 2018.
- FRIEDRICH, T.; KIENZLE, J. **Conservation agriculture: Impact on farmer's livelihoods, labour, mechanization and equipment**. Rome: FAO, 2020.
- GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; BAGGIO, G. Modes of application of cobalt, molybdenum and *Azospirillum brasilense* on soybean yield and profitability. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 180-185, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n3p180-185>.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWELK, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer, 2006. p. 123-140.
- HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.
- HUNGRIA, M. Bacterial nitrogen fixation in the tropics: the *Azospirillum-Bradyrhizobium* symbiotic association. In: PETERS, S.; ALVES, B.J.R. (Eds.). **Nitrogen cycling in the Americas: natural and anthropogenic influences and controls**. Springer, 2007.
- HUNGRIA, M. et al. Advances in *Azospirillum* inoculant technology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 136-142, 2010.
- HUNGRIA, M. et al. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. In: KHAN, M.S.; MEGHWAL, R.R. (Eds.). **Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture**. Springer, 2018.

- HUNGRIA, M. et al. Biological nitrogen fixation and its environmental impact. In: SINGH, D.P.; SINGH, H.B. (Eds.). Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Springer, 2020.
- HUNGRIA, M. et al. Challenges and opportunities for the use of *Azospirillum* in agriculture. In: KUMAR, M.; KUMAR, V. (Eds.). Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives. Springer, 2021.
- HUNGRIA, M. et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum brasilense* enhances nodule formation and nitrogen fixation. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 53, n. 9, p. 1061-1069, 2018.
- HUNGRIA, M. et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum brasilense*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n. 2, p. 123-133, 2013.
- HUNGRIA, M. et al. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. Biology and Fertility of Soils, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculant preparation, production and application. In: DILWORTH, M.J.; et al. (Eds.). Biological nitrogen fixation, sustainability and environmental challenges. Springer, 2015.
- HUNGRIA, M. et al. Soil biological properties in response to *Azospirillum brasilense* inoculation in maize grown under drought stress. European Journal of Soil Biology, v. 87, p. 60-68, 2021.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAÚJO, R.S. Sustainable agriculture: the role of biological nitrogen fixation. In: DIXON, R. et al. (Eds.). Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Springer, 2020.
- MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. Química e mineralogia do solo: parte I – conceitos básicos. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.
- NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007.
- SANTOS, R. F. et al. **Cultivares de soja na presença de *Azospirillum***. In: Anais do Congresso Brasileiro de Soja, Londrina: Embrapa Soja, 2018. p. 234-245.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 764 p.
- VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.