

Efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da soja
Effect of co-inoculation of plant growth promoting bacteria on soybean crop
Efecto de la coinoculación de bacterias promotoras del crecimiento en el cultivo de soja

Recebido: 19/12/2020 | Revisado: 21/12/2020 | Aceito: 22/12/2020 | Publicado: 27/12/2020

Fabiano Pacentchuk

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7477-1017>

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil

E-mail: fabianopacentchuk@gmail.com

Juliana Marcolino Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2076-1080>

Total Bio, Brasil

E-mail: pesquisa1@totalbiotecnologia.com.br

Vanderlei Aparecido de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1569-8723>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: valima66@gmail.com

Marcelo Cruz Mendes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2336-2306>

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil

E-mail: mcmendes@unicentro.br

Itacir Eloi Sandini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1105-7881>

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil

E-mail: isandini@hotmail.com

Sidnei Osmar Jadoski

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6064-2767>

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil

E-mail: sjadoski@unicentro.br

Resumo

A cultura da soja, apresenta com frequência limitações de produtividade, muitas das quais são oriundas de problemas nutricionais, sobretudo pelo fornecimento insuficiente de N. Um das

maneiras para sobrepujar esse problema é por meio de co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), de modo a potencializar a FBN e facilitar a aquisição de N e de outros nutrientes no solo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da co-inoculação, entre *B. japonicum* e BPCP's, na produtividade, na nodulação e nos componentes de rendimento da cultura da soja. Foram realizados quatro experimentos na safra 2017/18, os ensaios foram realizados em DBC no esquema fatorial 4 x 12, sendo: quatro (4) locais (Guarapuava/PR, Lapa/PR, Santa Maria do Oeste/PR e Sertão/RS) e 12 tratamentos (uso de BPCP's associadas com a inoculação padrão). Foi avaliada a produtividade, a nodulação e os componentes de rendimento da cultura da soja. Os resultados obtidos, ainda que positivos na sua maioria, foram variáveis em função de cada local, a variabilidade dos resultados pode ser diminuída por meio do uso de consórcios bacterianos. As BPCP's proporcionaram incrementos na massa e no número de nódulos, massa de mil grãos, número de grãos por planta, e essas características estão diretamente relacionadas com a produtividade da cultura. Foi observado que as BPCP's, em co-inoculação com o *B. japonicum*, sobretudo do gênero *Bacillus*, propiciaram incrementos de produtividade na cultura da soja, logo se mostraram como importante alternativa para serem utilizadas em co-inoculação com *B. japonicum* na cultura da soja.

Palavras-chave: *A. brasilense*; *Bacillus*; Bactérias promotoras do crescimento de plantas; Co-inoculação; Inoculação; Nitrogênio; Soja.

Abstract

The soybean crop often presents limitations on yield, many of which stem from nutritional problems, mainly due to insufficient supply of N. One of the ways to overcome this problem is through co-inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPB), in order to potentiate the BNF and facilitate the acquisition of N and other nutrients in the soil. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of co-inoculation, between *B. japonicum* and PGPB, on yield, nodulation and yield components of soybean crop. Four experiments were carried out in the 2017/18 crop season, the tests were carried out in randomized blocks in a 4 x 12 factorial scheme, being: four (4) locations (Guarapuava/PR, Lapa/PR, Santa Maria do Oeste/PR and Sertão/RS) and 12 treatments (use of PGPB associated with standard inoculation). Yield, nodulation and yield components of soybean were evaluated. The results obtained, although mostly positive, were variable depending on each location, the variability of the results can be reduced with bacterial pools. PGPB's provided increases in mass and number of nodules, mass of a thousand grains, number of grains per plant, and these characteristics are directly

related to the yield of the crop. It was observed that the PGPB, in co-inoculation with *B. japonicum*, mainly of the *Bacillus* genus, provided increases in productivity in the soybean culture, soon they showed themselves as an important alternative to be used in co-inoculation with *B. japonicum* in the soybean crop.

Keywords: *A. brasilense*; *Bacillus*; Plant growth promoting bacteria; Coinoculation; Inoculation; Nitrogen; Soybean.

Resumen

El cultivo de la soja presenta limitaciones en el rendimiento, muchas de las cuales se derivan de problemas nutricionales, principalmente por un aporte insuficiente de N. Una de las formas de superar este problema es mediante la coinoculación con bacterias que favorecen el crecimiento de las plantas (BPCP), con el fin de potenciar el FBN y facilitar la adquisición de N y otros nutrientes en el suelo. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la coinoculación, entre *B. japonicum* y BPCP's, sobre los componentes de rendimiento, nodulación y rendimiento del cultivo de soja. Se realizaron cuatro experimentos en el año 2017/18, los estudios se realizaron en bloques al azar en un esquema factorial 4 x 12, siendo: cuatro (4) ubicaciones (Guarapuava/PR, Lapa/PR, Santa Maria do Oeste/PR y Sertão/RS) y 12 tratamientos (uso de BPCP asociados con la inoculación estándar). Se evaluaron los componentes de rendimiento, nodulación y rendimiento de la soja. Los resultados obtenidos, aunque mayoritariamente positivos, fueron variables dependiendo de cada ubicación, la variabilidad de los resultados se puede reducir mediante el uso de pools bacterianos. El uso de las BPCP proporcionó incrementos en masa y número de nódulos, masa de mil granos, número de granos por planta, y estas características están directamente relacionadas con el rendimiento del cultivo. Se observó que los BPCP's, en coinoculación con *B. japonicum*, principalmente del género *Bacillus*, proporcionaron incrementos en el rendimiento del cultivo de soja, luego se mostraron como una alternativa importante para ser utilizados en coinoculación con *B. japonicum* en cultivo de soja.

Palabras clave: *A. brasilense*; *Bacillus*; Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas; Coinoculación; Inoculación; Nitrógeno; Soja.

1. Introdução

A cultura da soja é uma das mais importantes fontes de proteínas vegetais consumidas por seres humanos e animais (Gonçalves *et al.*, 2018; Peiretti *et al.*, 2019) e pode ser usada

como grão inteiro para alimentação humana direta ou é esmagada para ser usada como óleo e farinha (Narayanan & Fallen, 2019; Pimentel *et al.*, 2006). O óleo, o leite e a farinha de soja são alguns dos produtos da soja que se sobressaem, portanto, esta cultura se estabelece como uma das fontes mais importantes e baratas de proteínas e óleos vegetais (Gonçalves *et al.*, 2014; Lodhi *et al.*, 2015).

Neste sentido, são muito os fatores que interferem na produção desta cultura, como pragas, doenças, o fornecimento de nutrientes, dentre outros de igual importância. No que tange aos nutrientes, sabe-se que a elevada absorção de N é um requisito para cultivares de soja de alto rendimento (Santachiara *et al.*, 2017). Fundamentalmente, a absorção de N pelas plantas de soja é condicionada a duas fontes alternativas de N, da fixação biológica de N e a absorção de N no solo. A contribuição relativa de cada fonte de N é o resultado de condições ambientais, manejo e fatores genéticos (Córdova *et al.*, 2019; Salvagiotti *et al.*, 2008; Santachiara *et al.*, 2017).

É possível verificar na literatura que, para produzir uma tonelada de grãos de soja, são necessários cerca de 80 kg ha⁻¹ de N, deste total, de 50 a 80%, é fornecido pela FBN (Salvagiotti *et al.*, 2008). Em condições de alto rendimento, o N advindo do solo e da FBN podem não ser suficientes para sustentar as taxas de absorção de N exigido durante o período de produção de grãos e que possa atender à demanda de N necessária para atingir o rendimento máximo possível da cultura da soja (Salvagiotti *et al.*, 2009). Além disso, a FBN pode ser afetada por condições ambientais como temperatura, teor de água, concentração de N, pH da rizosfera, estado nutricional das plantas, que inclui substratos e quantidade de C e N nas raízes, e variação genética na capacidade potencial de FBN (Liu *et al.*, 2011). Períodos mais longos de seca e altas temperaturas, devido às mudanças climáticas globais, que também afetam o Brasil, são uma ameaça à contribuição dos processos biológicos para a agricultura (Hungria *et al.*, 2015).

Deste modo, sabe-se que o rendimento da cultura da soja é frequentemente associado a absorção total de N e, em última análise, a absorção total de N depende da quantidade de N que é biologicamente fixada e/ou absorvida da solução do solo (Santachiara *et al.*, 2017). Este problema poderia ser superado com aplicações de N inorgânico. No entanto, a concepção de tal estratégia também deve lidar com a redução frequentemente observada na FBN quando N é aplicado superfície do solo ou incorporado na camada superior do solo (Salvagiotti *et al.*, 2008). Além do mais, a aplicação de fertilizantes nitrogenados está correlacionada com o consumo de combustível fóssil e as emissões de gases de efeito estufa resultantes de seu uso, e configuram, portanto, uma barreira para alcançar maior sustentabilidade na agricultura

(Shen *et al.*, 2018).

Embora talvez seja insuficiente para prover N para elevadas produtividades e seja afetada por fatores bióticos e abióticos, a FBN é a chave tanto para avanços de produção quanto para a sustentabilidade do solo a longo prazo (Córdova *et al.*, 2019). Ao pensar em aumentar a sustentabilidade da produção agrícola uma estratégia promissora é o uso das bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP's), que podem facilitar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, indiretamente ou diretamente (Arruda *et al.*, 2013; Glick, 2012, 2014; Shabanamol *et al.*, 2018; Spolaor *et al.*, 2016). Logo, dada a importância da cultura da soja para o Brasil, e a consciência das limitações atuais e potenciais futuras à fixação biológica de N₂ pela soja inoculada com *Bradyrhizobium* spp., e os possíveis benefícios do uso das BPCP's em co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. ecoa como uma interessante e promissora tecnologia para melhorar o desempenho da cultura da soja (Hungria *et al.*, 2015).

A estratégia de inocular a semente de soja com mais de um microrganismo, ou seja, co-inoculação representa, assim, uma nova ferramenta biotecnológica para melhorar o rendimento da soja sem adicionar fertilizantes químicos nitrogenados, o que contribuirá para as práticas atuais de sustentabilidade na agricultura (Hungria *et al.*, 2015).

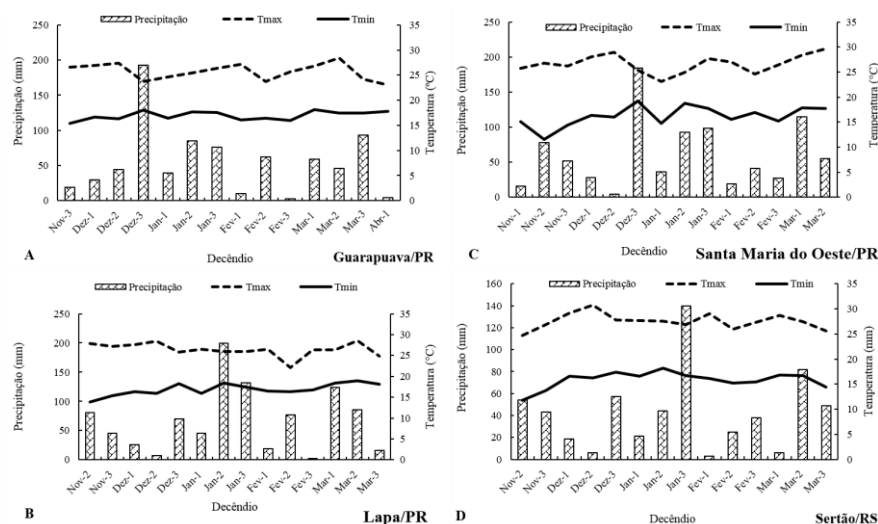
Assim, devido à escassez de estudos que se propõem a avaliar a possibilidade de uso de BPCP's na co-inoculação da cultura da soja, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da co-inoculação da cultura da soja com BPCP's do gênero *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, em diferentes condições edafoclimáticas, na produtividade, nodulação e número de grãos da cultura.

2. Metodologia

Foram realizados quatro experimentos em locais com condições edafoclimáticas distintas, os ensaios foram conduzidos em: Guarapuava/PR, Lapa/PR, Santa Maria do Oeste/PR e Sertão/RS. As informações relativas a cada local estão descritas na Tabela 1, as informações sobre precipitação, temperatura máxima e mínima estão apresentadas na Figura 1. Os ensaios foram realizados em delineamento de blocos ao acaso (DBC) com seis repetições e arranjo fatorial 4 x 12, sendo: quatro (4) locais (Guarapuava/PR, Lapa/PR, Santa Maria do Oeste/PR e Sertão/RS) e 12 tratamentos, que estão demonstrados na Tabela 2. Com exceção do controle nitrogenado e do controle negativo, todos os demais tratamentos foram co-inoculados com *B. japonicum* e outro microrganismo que compunha o tratamento (Tabela

2).

Figura 1. Temperatura máxima média, mínima média e precipitação pluvial acumulada por decêndios em Guarapuava/PR (A), Lapa/PR (B), Santa Maria do Oeste/PR (C) e Sertão/RS (D), durante a condução dos ensaios.



Fonte: Autores.

Tabela 1. Descrição dos locais e manejos realizados na cultura da soja nos ensaios na safra 2017/18.

Descrição	Local			
	Guarapuava/PR	Lapa/PR	S ^t M do Oeste/PR	Sertão/RS
Cultura anterior Verão	Soja	Pastagem Perene	Soja	Soja
Cultura anterior Inverno	Aveia	Pastagem Perene	Aveia	Azevém
Localização				
Latitude	25° 22' 59" S	25° 50' 52,3" S	24° 54' 4,91" S	28° 01' 37" S
Longitude	51° 33' 14,5" W	49° 39' 8,4" W	51° 51' 57,02" W	52° 15' 52" W
Altitude Metros	995	855	1051	720
Semeadura	23/11/2017	15/11/2017	10/11/2017	18/11/2017
Estádio V4	17/12/2017	09/12/2017	04/12/2017	12/12/2017
Colheita	02/04/2018	25/03/2018	20/03/2018	28/03/2018
Textura Solo				
Argila (g/kg)	590	220	570	560
Silte (g/kg)	290	310	280	270
Areia (g/kg)	120	470	150	170
Classe Textural	Argilosa	Média	Argilosa	Argilosa
Análise Química Solo (0 a 20 cm de profundidade)				
pH (CaCl)	5,16	5,43	5,43	5,06
M.O. (g/dm ³)	3,76	5,50	5,50	45,94
P - Mehlich (mg/dm ³)	2,57	4,37	4,37	18,14
K (cmol/dm ³)	0,28	0,62	0,62	0,23
Ca (cmol/dm ³)	5,33	6,06	6,06	7,18
Mg (cmol/dm ³)	1,77	2,07	2,07	2,4
Al (cmol/dm ³)	0,00	0,00	0,00	0,05
H+Al (cmol/dm ³)	4,95	3,96	3,96	6,03
SB (cmol/dm ³)	7,38	8,75	8,75	9,81
CTC- pH 7.0 (cmol/dm ³)	12,33	12,71	12,71	16,1

Fonte: Autores.

Cada unidade experimental foi constituída de 10 linhas com espaçamento entre linhas

de 0,45 m, e comprimento de 6,0 m, o que totalizou uma área de 27 m². A semeadura foi realizada em sistema de plantio direto, utilizando-se a cultivar Jacutinga IPRO, na densidade de 250.000 sementes ha⁻¹. As datas de semeadura assim como outras informações sobre o manejo estão demonstradas na Tabela 1. As áreas experimentais foram dessecadas com glifosato (720 g ha⁻¹ do i. a.) 15 dias antes da semeadura. Na adubação de base utilizou-se, para todos os locais, 00-80-60 kg ha⁻¹ de N, fósforo (P₂O₅) e potássio (K₂O), respectivamente. Durante o ciclo da cultura foram efetuados controles fitossanitários para o controle das pragas, doenças e plantas daninhas.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos aplicados, em todos os locais estudados, na cultura da soja, na safra 2017/18.

	Tratamento	Aplicação	Concentração (UFC mL ⁻¹)	Dose (mL)
1	<i>A. brasilense</i> (TS)	TS ¹	2 x 10 ⁸	100
2	<i>P. fluorescens</i> (TS)	TS ¹	1 x 10 ⁸	100
3	Azo + <i>P. fluorescens</i> (TS)	TS ¹	2 x 10 ⁸ /1 x 10 ⁸	150
4	<i>B. subtilis</i> (TS)	TS ¹	1 x 10 ⁸	50
5	<i>B. subtilis</i> (V3)	V3 ²	1 x 10 ⁸	300
6	<i>B. subtilis</i> (Sulco)	Sulco ²	1 x 10 ⁸	100
7	<i>B. pumilus</i> (TS)	TS ¹	1 x 10 ⁸	50
8	Consórcio bact. (TS)	TS ¹	1 x 10 ⁸	15
9	Consórcio bact. (Sulco)	Sulco ²	1 x 10 ⁸	50
10	Ctrl. Positivo	TS ¹	1 x 10 ⁸	-
11	Ctrl. Nitrogenado ³	-	-	-
12	Ctrl. Negativo	-	-	-

1 – Dose em mL para 50 kg de sementes.

2 – Dose em mL por hectare.

3 – 200 kg ha⁻¹ de N aplicado em cobertura no V4.

4 – 100 mL para 50 kg de sementes, aplicado no TS por meio do produto comercial Total Nitro.

Fonte: Autores.

O TS foi realizado em local sombreado, momentos antes da semeadura. A aplicação em V3, por sua vez, foi realizada quando o segundo trifólio estava completamente desenvolvido (Fehr & Caviness, 1977). A taxa de aplicação utilizada foi de 160 L ha⁻¹ e pressão constante, por meio de pulverizador costal elétrico. A aplicação foi realizada a partir das 16h00, com o objetivo de evitar elevadas temperaturas. Quando necessária, a aplicação no sulco foi realizada de maneira simultânea com a semeadura, foi utilizado taxa de aplicação de 100 L ha⁻¹. A aplicação de N em cobertura foi realizada no estágio fenológico de V4, conforme a escala proposta por Fehr & Caviness (1977), nas doses correspondentes a cada

tratamento. A fonte de N utilizada foi a ureia (45% de N).

As variáveis estudadas foram: produtividade, massa de mil grãos, MS de parte aérea, massa seca de raiz, número de nódulo, massa de nódulo, altura de inserção do primeiro ramo reprodutivo, altura de planta, número de grãos por planta, teor de N nos grãos e teor de N na planta.

Após a maturidade fisiológica foram colhidas quatro linhas centrais da parcela, desprezou-se 0,50 metro de cada cabeceira, sendo posteriormente feita a trilhagem e secagem do material; determinou-se, então, a produtividade (kg ha^{-1}) de grãos a 14% de umidade. A partir de uma subamostra do material colhido, foi realizada para cada parcela, a contagem e pesagem de 300 grãos, e a partir destes valores, foi calculado a massa de mil grãos.

Para a avaliação do número de nódulos foram colhidas três plantas por parcela no estádio de R1/R2 (Fehr & Caviness, 1977). As plantas foram cortadas ao nível do solo, e com um cilindro com volume de 942 cm^3 (cilindro com 10 cm de diâmetro por 12 cm de altura) as raízes dessas plantas foram coletadas e posteriormente lavadas, após a lavagem das raízes, procedeu-se a retirada e contagem dos nódulos. Em seguida, os mesmos foram levados a estufa de ventilação forçada de ar a 65°C por 72 horas e em seguida realizado pesagem para obtenção da massa seca de nódulos.

Ainda, coletou-se 10 plantas e por meio de contagem direta, obteve-se o número de grãos por planta. Para determinar o teor de N na parte aérea foram coletadas subamostras da amostragem realizada para determinação da massa seca de parte aérea. Os grãos submetidos a avaliação do teor de N no grão foram obtidos na colheita. As amostras de folhas e grãos foram levadas para estufa de secagem por ventilação forçada de ar a 65°C , até obter peso constante. Posteriormente as amostras foram moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de 1mm de diâmetro, e após a moagem as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da UNICENTRO, para determinação dos teores de N na parte aérea e no grão. As análises foram conduzidas conforme a metodologia proposta pelo Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (Silva, 2009).

Para a análise estatística, a normalidade dos dados foi analisada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov, 1941; Razali & Wah, 2011; Smirnov, 1948), a homogeneidade dos dados, por sua vez, foi verificada por meio do teste de Cochran (Cochran, 1947), ambos os testes foram realizados por meio do Software Statistica 8. Depois de comprovada a normalidade dos dados e à homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância e avaliados pelo Teste F. Ainda, foi realizado a análise de componentes principais (PCA), para tal análise os dados foram primeiramente padronizados

por meio da fórmula apresentada na equação 1.

$$Z = (X - \bar{X}) / DP$$

Sendo:

Z – valor padronizado;

X – número a ser padronizado;

\bar{X} – média dos valores;

DP – Desvio padrão dos valores.

Após a padronização dos dados procedeu-se a análise de fator, cujo objetivo foi, por meio de técnicas multivariadas, evidenciar variáveis latentes (fatores) que influenciam na variabilidade de um grupo ou de todas as variáveis originais (Neisse & Hongyu, 2016). Para esta análise optou-se pelo fator de rotação “Varimax raw” (Kaiser, 1958) e as variáveis que apresentaram valores de comunalidade inferiores a 0,7 foram eliminadas (Bomfim *et al.*, 2011). Uma vez realizada a análise de fator, procedeu-se a Análise de Componentes Principais.

3. Resultados

Para todas as variáveis estudadas houve interação ($p < 0,01$) Tratamento x Local (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância com os valores de quadrado médio para as variáveis produtividade, massa de mil grãos (MMG), número de nódulo e massa de nódulo e número de grãos por planta da cultura da soja dos ensaios realizados na safra 2017/18.

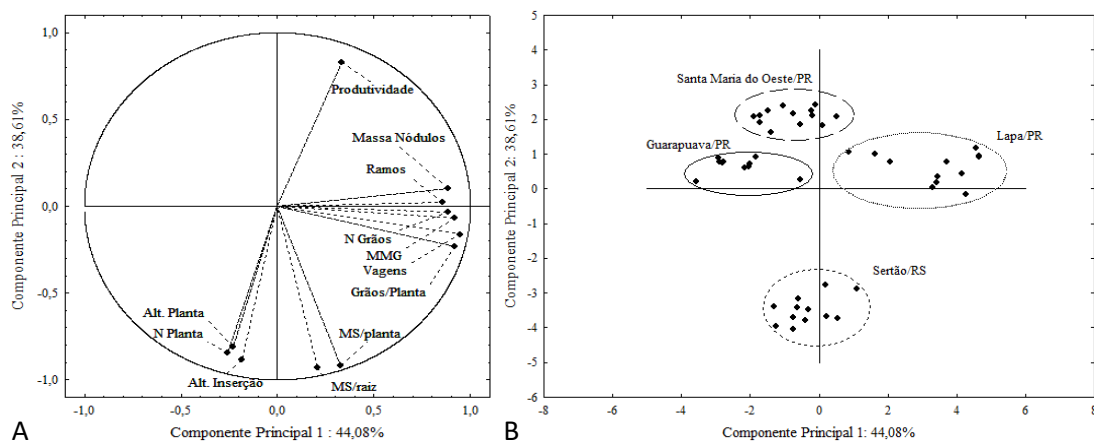
FV	GL	Quadrado Médio				
		Produtividade	MMG	Núm. Nódulo	Massa Nódulo	Grãos/planta
Bloco	5	45196,79 ns	17,50 ns	320,78 ns	3628,50 ns	39,24 ns
Local (L)	3	16817972,37 **	54747,41 **	8510,52 **	1300063,74 **	23917,32 **
Tratamento (T)	11	457585,65 **	54,06 **	3088,29 **	101990,50 **	862,45 **
L x T	33	94213,52 **	30,72 **	752,53 **	26163,64 **	704,60 **
Erro	235	36362,15	12,24	148,26	1998,57	36,5
CV (%)	-	4,44	2,18	9,25	8,36	6,05
Média	-	4292	160,56	131,58	534,81	99,83

FV – fonte de variação; GL – graus de liberdade; CV (%) – coeficiente de variação; ** significativo a 1%; ns – não significativo.

Fonte: Autores.

Ao observar os dados da PCA que analisou os locais estudados conjuntamente, verifica-se que na CP1, que explica 44,08% dos dados, a maior produtividade foi obtida no ensaio realizado na Lapa/PR, enquanto que produtividades intermediárias foram observadas nos ensaios de Santa Maria do Oeste/PR e Guarapuava/PR, por fim, o ensaio que apresentou menor relação com a produtividade foi o conduzido em Sertão/RS. O comportamento diferenciado entre os locais, demonstra a existência da interação Local x Tratamento, o que corrobora com os dados da Tabela 3. Na média dos locais, a produtividade estava diretamente relacionada com as variáveis massa de nódulos, MMG e grãos/planta (Figura 2).

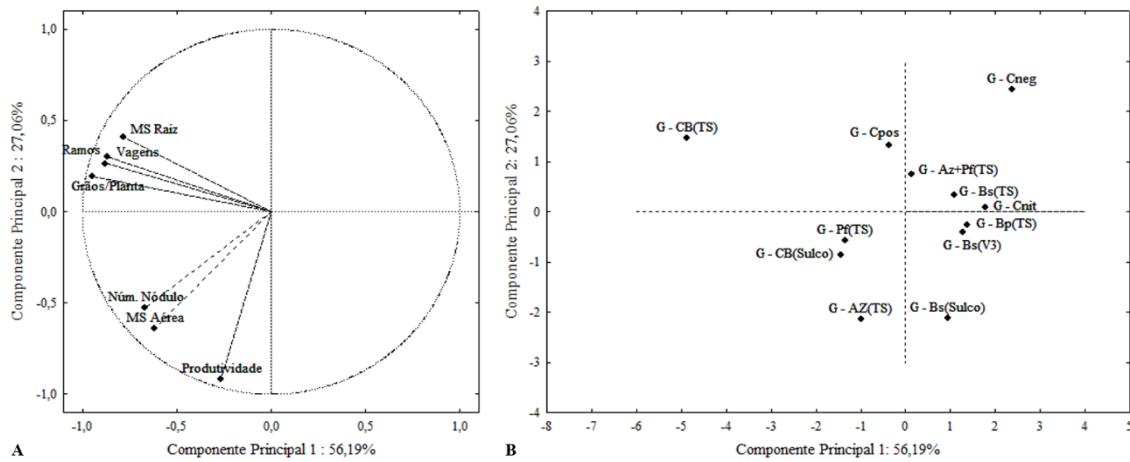
Figura 2. Gráfico de escores (A) e gráfico de pesos das variáveis (B) da análise conjunta dos dados da safra 2017/18 da cultura da soja.



Fonte: Autores.

Ao observar os locais de maneira separada, verificou-se na PCA que para o ensaio conduzido em Guarapuava/PR, a CP1, que explica 56,19% dos dados, demonstra que as maiores produtividades da cultura da soja neste local foram obtidas por meio dos tratamentos *A. brasilense* aplicado no TS, consórcio bacteriano aplicado no TS e *P. fluorescens*. Ainda, é possível verificar também que, neste local, a produtividade foi influenciada diretamente pelo número de nódulos e número de grãos/planta. Por fim, verifica-se que o controle negativo e o controle nitrogenado apresentaram relação inversa com a produtividade da cultura (Figura 3).

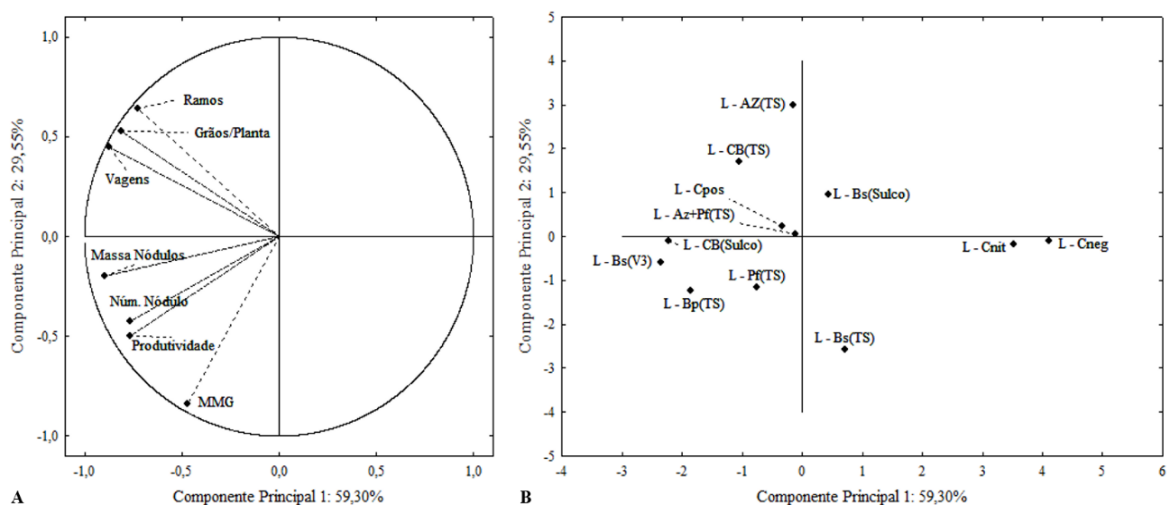
Figura 3. Gráfico de escores (A) e gráfico de pesos das variáveis (B) no ensaio realizado no município de Guarapuava/PR na safra 2017/18 da cultura da soja.



Fonte: Autores.

Segundo a PCA realizada com os dados do ensaio da Lapa/PR, a CP1, que explica 59,30% dos dados, indica que as maiores produtividades foram obtidas pelos tratamentos *B. subtilis* aplicado no V3, *B. pumilus*, consórcio bacteriano no sulco e *P. fluorescens*. A produtividade, neste local, apresentou relação positiva com a MMG, número de nódulos e massa de nódulos. O *B. subtilis* no sulco, controle nitrogenado e controle negativo apresentaram relação inversa com a produtividade (Figura 4).

Figura 4. Gráfico de escores (A) e gráfico de pesos das variáveis (B) no ensaio realizado no município de Lapa/PR na safra 2017/18 da cultura da soja.

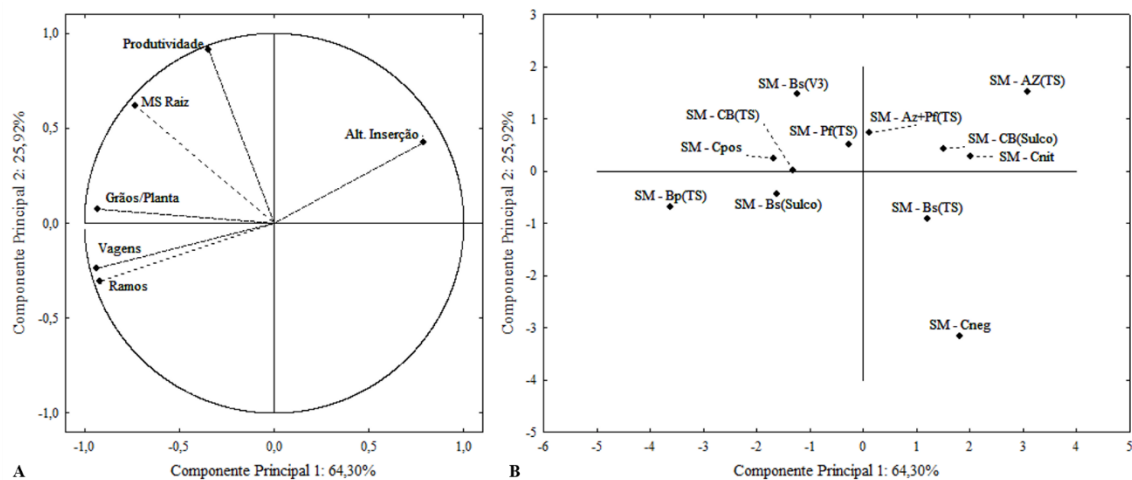


Fonte: Autores.

De acordo com a PCA realizada para o ensaio conduzido em Santa Maria do

Oeste/PR, a CP1, que explica 64,30% dos dados, demonstra que os tratamentos *B. subtilis* aplicado no V3, consórcio bacteriano no sulco, *B. subtilis* no sulco, *P. fluorescens* e controle positivo apresentaram relação com as maiores produtividades neste ensaio. Ainda, a produtividade, neste local, está diretamente relacionada com o número de grãos/planta (Figura 5).

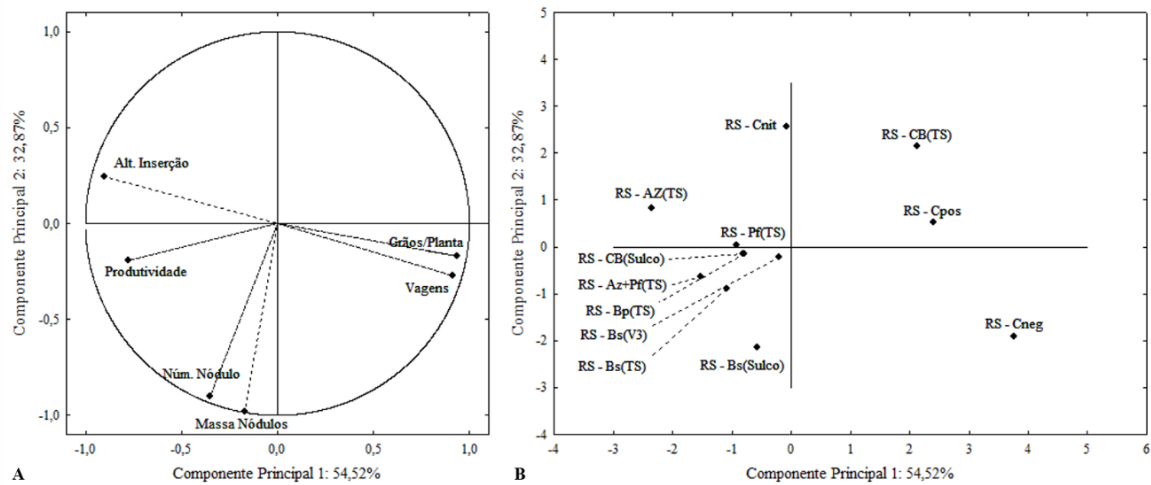
Figura 5. Gráfico de escores (A) e gráfico de pesos das variáveis (B) no ensaio realizado no município de Santa Maria do Oeste/PR na safra 2017/18 da cultura da soja.



Fonte: Autores.

Conforme a PCA realizada para o ensaio conduzido em Sertão/RS, a CP1, que explica 54,52% dos dados, demonstra que a produtividade apresenta relação direta com o número e massa de nódulos. Os tratamentos que se relacionaram positivamente com a produtividade foram consórcio bacteriano no sulco, *B. subtilis* no V3, *B. subtilis* no sulco, *B. pumilus* e *A. brasilense* + *P. fluorescens*. Ainda, os tratamentos controle negativo e controle positivo apresentaram relação inversa com a produtividade da cultura neste local (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de escores (A) e gráfico de pesos das variáveis (B) no ensaio realizado no município de Sertão/RS na safra 2016/17 da cultura da soja.



Fonte: Autores.

Os efeitos dos tratamentos sobre a cultura foram analisados também por comparação de média. Os tratamentos se comportaram de maneira distinta em função dos locais estudados, o que demonstra a existência de interação Local X Tratamento. Sem exceção, as menores produtividades foram verificadas no ensaio desenvolvido em Sertão/RS. Por outro lado, as maiores produtividades foram verificadas no ensaio conduzido em Lapa/PR. É importante destacar que nos tratamentos consórcio bacteriano no sulco, *B. subtilis* no sulco, *A. brasilense* + *P. fluorescens*, *A. brasilense*, *P. fluorescens* e controle nitrogenado não houve diferença estatística entre os ensaios conduzidos em Guarapuava/PR, Lapa/PR e Santa Maria do Oeste/PR (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação dos efeitos dos tratamentos sobre a produtividade, massa de mil grãos, número de nódulo, massa de nódulos e número de grãos por planta da cultura da soja cultivada em diferentes locais.

Trat.*	Guarapuava (PR)	Lapa (PR)	Sta Maria Oeste (PR)	Sertão (RS)	Guarapuava (PR)	Lapa (PR)	Sta Maria Oeste (PR)	Sertão (RS)
Produtividade (kg ha⁻¹)				Massa de mil grãos (g)				
1	4647 a A	4492 b A	4529 a A	3682 a B	133,17 a C	193,31 b A	152,48 a B	158,72 b B
2	4494 b A	4725 a A	4499 a A	3602 a B	131,67 a D	200,53 a A	155,52 a C	161,29 a B
3	4447 b A	4723 a A	4627 a A	3614 a B	130,09 a D	197,83 a A	154,99 a C	158,94 b B
4	4268 c B	4812 a A	4246 a B	3520 b C	132,00 a D	201,93 a A	149,90 b C	161,45 a B
5	4419 b B	4944 a A	4750 a A	3730 a C	130,92 a D	201,38 a A	155,95 a C	161,32 a B
6	4662 a A	4558 a A	4511 a A	3717 a B	134,00 a D	196,44 b A	154,08 a C	160,03 b B
7	4432 b B	4886 b A	4460 a B	3700 a C	131,21 a D	201,11 a A	150,70 b C	158,61 b B
8	4348 c B	4803 a A	4529 a AB	3385 b C	135,16 a D	195,17 b A	145,13 c C	157,94 b B
9	4584 a A	4808 a A	4543 a A	3770 a B	132,00 a D	198,91 a A	152,24 a C	163,56 a B
10	4291 c B	4655 b A	4492 a AB	3468 b C	132,54 a D	198,42 a A	152,46 a C	159,50 a B
11	4412 b A	4552 b A	4420 a A	3554 b B	133,21 a D	197,44 a A	151,87 a C	162,10 a B
12	4035 d B	4466 b A	3856 b B	3367 b C	130,70 a D	193,87 b A	148,16 b C	156,98 b B
Número de nódulos planta⁻¹				Massa de nódulos (g)				
1	151,67 a A	125,83 b A	137,92 a A	118,00 b A	443,33 a C	661,67 c A	533,33 a B	462,50 e B
2	145,67 a A	150,75 a A	153,08 a A	119,75 b B	450,00 a C	750,83 b A	560,00 a B	513,33 d BC
3	135,17 a A	131,5 b BC	147,67 a AB	130,25 a C	426,67 a C	705,00 c A	572,50 a B	567,50 c C
4	138,17 a A	140,00 a A	141,17 a A	138,17 a A	430,83 a C	699,17 c A	540,83 a B	561,67 c B
5	145,17 a A	139,00 a A	149,83 a A	113,42 b B	441,67 a C	793,33 b A	583,33 a B	52000 d B
6	141,25 a A	129,92 b A	144,33 a A	138,67 a A	425,00 a C	674,17 c A	510,00 b B	655,00 a A
7	136,5 a A	138,42 a A	153,83 a A	116,5 b B	405,83 a C	890,83 a A	498,33 b B	523,00 d B
8	154,5 a A	119,33 c B	154,83 a A	85,75 d C	453,33 a C	770,00 b A	539,17 a B	352,50 f D
9	145,00 a A	145,42 a A	154,00 a A	116,6 b B	428,33 a C	865,00 a A	483,33 b BC	507,00 d B
10	123,58 b A	131,67 b A	141,75 a A	105,17 c B	388,33 b C	740,83 b A	567,50 a B	427,50 e C
11	110,58 b A	105,17 c A	101,67 c A	93,00 d A	205,00 c C	515,00 e A	363,33 c B	307,50 f B
12	110,00 b A	111,75 c A	127,17 b A	127,33 a A	346,67 b B	605,83 d A	410,83 c B	594,17 b A
Número de grãos planta⁻¹								
1	66,97 a C	106,74 b A	86,9 b B	85,87 b B				
2	64,39 a C	109,09 a A	86,07 b B	89,71 a B				
3	67,39 a C	106,27 b A	83,89 b B	88,15 a B				
4	61,17 b C	106,68 b A	86,42 b B	88,39 a B				
5	57,45 c C	107,55 b A	90,94 a B	87,29 a B				
6	68,05 a C	107,42 b A	82,74 b B	85,74 b B				
7	62,39 b C	110,78 a A	83,77 b B	81,74 b B				
8	66,51 a C	108,9 a A	90,36 a B	88,00 a B				
9	64,73 a C	108,92 a A	84,32 b B	86,6 b B				
10	64,64 a C	105,67 b A	85,97 b B	86,07 b B				
11	65,33 a C	110,28 a A	86,15 b B	86,08 b B				
12	64,75 a C	105,38 b A	85,13 b B	85,00 b B				

* Os tratamentos estão descritos na tabela 1.

Fonte: Autores.

Para todos os tratamentos, houve diferenças estatísticas entre os locais estudados. Os maiores valores de MMG foram observados nos tratamentos no ensaio conduzido em Lapa/PR, por outro lado, os menores valores desta variável foram notados no ensaio de Guarapuava/PR. Valores intermediários foram verificados em Sertão/RS e Santa Maria do Oeste/PR. Por fim, verifica-se que em cada local, os tratamentos se comportaram de maneira diferenciada (Tabela 4).

Não houve diferença, entre os locais estudados, para o número de nódulos por planta nos tratamentos *A. brasilense*, *B. subtilis* no sulco, *B. subtilis* no TS, controle negativo e controle nitrogenado. Além disso, para os tratamentos *B. pumilus*, *B. subtilis* no V3, consórcio bacteriano no sulco, controle positivo e *P. fluorescens*, não houve diferença, entre os ensaios

de Guarapuava/PR, Lapa/PR e Santa Maria do Oeste/PR, mas os ensaios conduzidos nestes locais apresentaram número de nódulos por planta estatisticamente superior ao verificado no ensaio de Sertão/RS. Por fim, para cada local estudado, houve comportamento diferenciado dos tratamentos (Tabela 4).

Com exceção dos tratamentos *B. subtilis* no sulco e do controle negativo, para todos os demais tratamentos estudados os maiores valores de massa de nódulos foram obtidos no ensaio conduzido em Lapa/PR e se diferiram estatisticamente dos demais locais estudados. As menores massas de nódulos, com exceção dos tratamentos *P. fluorescens*, *A. brasilense* + *P. fluorescens* e controle positivo, foram verificadas no ensaio conduzido em Guarapuava/PR. É importante salientar que os tratamentos, dentro de cada local, apresentaram comportamento distinto (Tabela 4).

Com exceção dos tratamentos controle nitrogenado e controle negativo, para todos os demais tratamentos estudados o maior número de grãos/planta foi observado no ensaio conduzido na Lapa/PR e se diferiu estatisticamente dos demais locais. Ainda, para os tratamentos controle positivo, *B. subtilis* no sulco, *B. pumilus*, *B. subtilis* no V3 e *A. brasilense*, o menor valor para esta variável foi verificado em Guarapuava/PR e se diferiu estatisticamente dos demais locais. Por fim, para cada local houve comportamento diferenciado dos tratamentos (Tabela 4).

4. Discussão

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que a co-inoculação entre *B. japonicum* e *A. brasilense* proporcionou incremento de produtividade na cultura da soja, o que corrobora com Armendariz *et al.*, (2019), estes autores sugerem que a dupla inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* pode ser uma prática segura e vantajosa para melhorar o crescimento e a produtividade da soja. A co-inoculação com *B. japonicum* e *Azospirillum* spp. representa uma nova estratégia que pode melhorar o rendimento das culturas (Fukami *et al.*, 2018). É possível que a co-inoculação com as BPCP's, neste caso o *Azospirillum brasilense* e *B. japonicum*, possa resultar na formação precoce de nódulos em soja, devido ao aumento do número de pelos radiculares disponíveis para serem infectados por *B. japonicum* (Chibeba *et al.*, 2015). Desta maneira, a co-inoculação entre estes microrganismos proporcionará aumento na eficiência da fixação biológica de nitrogênio e possibilitará ainda, maior absorção de água e nutrientes, e finalmente incremento em produtividade (Galindo *et al.*, 2018).

Entretanto, os resultados também evidenciaram que em alguns locais a co-inoculação, entre *B. japonicum* e *A. brasilense*, não apresentou resultados positivos, como por exemplo o ensaio conduzido na Lapa/PR (Tabela 3). Portanto, a resposta positiva da inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* na produtividade de grãos é variável e dependente das condições ambientais durante a estação de crescimento, especialmente a baixa taxa de precipitação, que pode interferir na nodulação das raízes (Steiner *et al.*, 2019).

Ainda que a literatura, e os dados deste estudo, tenham destacado os efeitos positivos do uso do *A. brasilense* em co-inoculação com *B. japonicum*, é importante destacar que outras BPCP's como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* e *P. fluorescens* também apresentaram resultados positivos na co-inoculação da cultura da soja. O gênero *Bacillus* engloba algumas das BPCP's mais importantes para aumentar o crescimento das plantas, influenciar positivamente a germinação, o desenvolvimento e o rendimento das culturas devido à produção de substâncias promotoras de crescimento, o que demonstra melhora na nutrição das plantas (Gagné-Bourque *et al.*, 2015).

A co-inoculação com *P. fluorescens* também demonstrou resultados promissores, resultados estes que corroboram com Novinscak *et al.*, (2019), de acordo com estes autores o uso de *P. fluorescens*, quando inoculadas via semente, demonstraram capacidade de aumentar a biomassa vegetal e o rendimento de óleo de sementes em soja e canola (*Brassica napus* L.). Além disso, Rotaru (2015) destaca que a aplicação de *P. fluorescens* desempenha papel importante na modulação da atividade da fosfatase ácida da superfície da soja e estas podem ter um impacto benéfico na aquisição de P, possivelmente por meio da mobilização do P orgânico.

Assim, em todos os locais estudados foi possível verificar que as BPCP's, em co-inoculação com o *B. japonicum*, propiciaram incrementos de produtividade na cultura da soja, o que concorda com Pérez-Montañó *et al.*, (2014), de acordo com estes autores, estudos de co-inoculação com *B. japonicum* e as BPCP's tornaram-se prática cada vez frequente no desenvolvimento da agricultura sustentável. A co-inoculação representa, assim, uma nova ferramenta biotecnológica para melhorar o rendimento da soja sem adicionar fertilizantes químicos N, o que contribui para as práticas atuais de sustentabilidade na agricultura (Hungria *et al.*, 2015).

Todavia, é importante salientar que os resultados foram variáveis em função de cada local. Resultados análogos foram observados por Szilagyi-Zecchin *et al.*, (2017), de acordo com estes autores mesmo quando a inoculação é realizada de maneira uniforme, o efeito desta na produtividade de grãos é variável de acordo com o genótipo da planta, solo e ambiente.

Desta forma, faz-se necessários estudos sob as mais variadas condições de campo, além do mais, a pesquisa deve ser proativa, de maneira que os testes de campo devem ser estabelecidos em uma ampla variedade de solo e ambiente (Saikia *et al.*, 2010; Zafar *et al.*, 2012).

Uma das maneiras de minimizar os efeitos de local é o uso de mais de um microrganismo em conjunto com o *B. japonicum*, como realizado por meio dos tratamentos consórcio bacteriano e *A. brasilense* + *P. fluorescens*. Os resultados positivos obtidos com o consórcio bacteriano podem ser explicados pelos relatos de Dodd *et al.*, (2010) segundo estes autores, a combinação de espécies de BPCP's que apresentam diferentes características e que afetam o status hormonal da planta, modificam a arquitetura da raiz e disponibilizam recursos adicionais, como a solubilização de fosfato, pode aumentar a sustentabilidade da agricultura. Ainda, Etesami & Alikhani (2016) demonstram que a combinação de BPCP's pode melhorar a eficiência do uso de fertilizantes do que a inoculação dessas bactérias de maneira isolada.

Os resultados deste estudo demonstraram também que o consórcio bacteriano aplicado no sulco de semeadura apresentou resultados superiores aos obtidos quando esse tratamento foi aplicado no sulco de semeadura (Tabela 3). A diferença de resposta entre o uso do consórcio bacteriano no sulco de semeadura e no TS, permite inferir que o uso de microrganismos no TS pode ocasionar problemas como a toxicidade do tratamento químico de sementes que, porventura, comprometeria a viabilidade dos microrganismos, como alertado por (Sandini *et al.*, 2019). Mesmo que em alguns locais não houve respostas positivas, os achados deste estudo sugerem que a associação entre BPCP's – consórcio bacteriano – podem aumentar a estabilidade dos resultados em diferentes condições edafoclimáticas.

Embora os resultados obtidos foram variáveis, o que é evidentemente normal neste tipo de pesquisa, é importante destacar os efeitos benéficos das BPCP's verificados em todos os locais estudados. Não obstante, em função dos resultados obtidos e das análises realizadas é difícil afirmar com precisão qual foi ou quais foram os reais efeitos das BPCP's que impactaram positivamente a produtividade e alguns componentes de rendimento da cultura da soja, assim como descrito por (Hungria *et al.*, 2015). Todavia, sabe-se que os microrganismos estudados podem impactar positivamente a produtividade da cultura de maneira direta, indireta ou inclusive devido à combinação das duas maneiras (Fukami *et al.*, 2018; Lim & Kim, 2013; Marinković *et al.*, 2018; Masciarelli *et al.*, 2014; Mustafa *et al.*, 2019; Santoyo *et al.*, 2016).

Neste contexto, o primeiro e quiçá um dos mais importantes efeitos da co-inoculação entre as BPCP's e *B. japonicum* é a melhoria da FBN. Segundo Steiner *et al.*, (2019) o uso

das BPCP's em associação ao *B. japonicum* pode otimizar a fixação biológica de nitrogênio. Assim, como verificado nos resultados deste estudo, as BPCP's proporcionam incrementos da massa e no número de nódulos. Os efeitos positivos da co-inoculação no número e na massa de nódulos podem ser devidos a vários mecanismos, o que inclui a FBN precoce dos nódulos, incremento na matéria seca do nódulo, promoção da ocorrência de nodulação por meio do aumento da formação de pelos radiculares e raízes secundárias, com incremento nos locais de infecção, inibição de patógenos, produção de fitohormônios e influências na partição da matéria seca entre raízes e parte aérea (Bárbaro *et al.*, 2009; Chibeba *et al.*, 2015; Juge *et al.*, 2012; Mustafa *et al.*, 2019; Steiner *et al.*, 2019).

Além disso, é possível verificar que a co-inoculação com *Azospirillum* e *B. japonicum* pode resultar na formação precoce de nódulos em soja, devido ao aumento do número de pelos radiculares disponíveis para serem infectados por *B. japonicum* (Chibeba *et al.*, 2015), ou seja, presume-se que o aumento da nodulação de plantas co-inoculadas seja uma resposta às alterações causadas pelo *Azospirillum* spp. na morfologia radicular (Saikia *et al.*, 2010).

Os resultados indicam também que nos ensaios conduzidos em Guarapuava/PR, Lapa/PR e Sertão/PR, a produtividade está diretamente relacionada com o número e a massa de nódulos. Os achados deste estudo concordam com os resultados de Dhami and Prasad (2009), de acordo com estes autores, houve forte correlação positiva ($r = 0,982$) entre o número de nódulos radiculares e o rendimento da cultura, o que sugere que ocorre otimização da nodulação da raiz pela inoculação de cepas compatíveis de BPCP's e *B. japonicum*.

Não obstante, em todos os locais estudados, as avaliações demonstraram que sempre havia nódulos no tratamento controle negativo (Tabela 4). A presença de nódulos, mesmo nos tratamentos sem inoculação e em áreas sem histórico do cultivo de soja demonstra que no solo, há estirpes nativas de *B. japonicum* e que essas possuem a capacidade de nodular as plantas de soja. Porém, mesmo com a presença de microrganismos nativos, quando realizou-se a inoculação – controle positivo – verificou-se aumento no número e massa de nódulos. Neste contexto, de acordo com Matoso & Kusdra (2014) altas populações de *Bradyrhizobium* spp. nativos, por si só, não são capazes de melhorar os indicadores de nodulação e fixação biológica de nitrogênio. Logo, existe a necessidade de re-inoculação com números elevados de células em inoculantes e/ou aplicação de cepas altamente competitivas de *B. japonicum* para superar as populações de solo residente e aumentar os benefícios da FBN na cultura da soja (Hungria & Mendes, 2015; Mendes *et al.*, 2000).

Outrossim, destaca-se, em função dos resultados deste estudo, o impacto negativo no número e na massa de nódulos ocasionado pelo controle nitrogenado (Tabela 3). A aplicação

de fertilizante nitrogenado na cultura da soja afetou negativamente o número de nódulos e a massa de nódulos, o que aponta baixo desempenho simbiótico, sem melhorar o rendimento das culturas (Cerezini *et al.*, 2016; Kaschuk *et al.*, 2016). É importante destacar que os impactos do uso de fertilizantes nitrogenados na fixação de N e no rendimento das culturas é variável em função das cultivares de soja, da estirpe de *B. japonicum* utilizada, da quantidade e da época de aplicação do N (Zuffo *et al.*, 2018). Por fim, achados de Santachiara *et al.*, (2017) demonstraram que a cada quilo de N mineral absorvido da solução do solo representa redução de 1,4 kg de N oriundo da FBN. De acordo com Saito *et al.*, (2014) quando os níveis de nitrato estão altos no solo, a planta promove o crescimento das raízes laterais para absorver eficientemente o nitrato. O maior consumo de fotoassimilados nas raízes durante a formação das raízes laterais reduz o suprimento de fotoassimilados aos nódulos e, posteriormente, reduz o crescimento dos nódulos e a atividade da FBN (McCoy *et al.*, 2018; Saito *et al.*, 2014).

Ainda, de acordo com Rego *et al.*, (2018) a co-inoculação de sementes de soja com *B. japonicum* e *A. brasilense* favorece o desenvolvimento das plantas, aumentando os componentes de rendimento, o rendimento de grãos e a qualidade das sementes. Os três principais componentes do rendimento, em soja, são: número de vagens por área, número de grãos por vagem e massa de grãos. Os achados deste estudo corroboram com Mundstock & Thomas (2005), segundo estes autores o número de vagens por planta, que culmina no número de grãos por planta, é o componente mais importante quando se busca aumentos no rendimento de grãos, devido à grande faixa de variação que pode ser obtida neste componente, o que garante parte da plasticidade fenotípica da soja.

Os resultados obtidos neste estudo, em diferentes locais, permitem inferir que as BPCP's são uma importante estratégia para aumentar a produtividade da cultura da soja sem aumentar o consumo de insumos que poderiam ser danosos ao ambiente.

5. Conclusões

Em todos os locais estudados foi possível verificar que as BPCP's, em co-inoculação com o *B. japonicum*, propiciaram incrementos de produtividade na cultura da soja;

As BPCP's que apresentaram maior estabilidade de resultados positivos entre os locais e safras foram *B. subtilis*, *B. pumilus* e *Bacillus* sp.;

O uso de mais de uma BPCP em co-inoculação com o *B. japonicum*, consórcio bacteriano, se mostra como alternativa para minimizar a variabilidade dos resultados devido as especificidades de cada local.

AS BPCP's proporcionaram incrementos na massa e no número de nódulos, e essas características estão diretamente relacionadas com a produtividade da cultura;

O uso das BPCP's influenciou positivamente os componentes de rendimento massa de mil grãos e número de grãos por planta, componentes de rendimento estes que mais se relacionaram positivamente com a produtividade;

Fazem-se necessários mais estudos afim de buscar melhor compreensão sobre o comportamento das BPCP's em diferentes condições edafoclimáticas. É importante também entender como cada BPCP impacta positivamente a cultura da soja, cujo objetivo é favorecer os efeitos positivos e simplificar a tomada de decisão sobre qual ou quais BPCP's podem ser usadas em determinadas situações;

Referências

Armendariz, A. L., Talano, M. A., Olmos Nicotra, M. F., Escudero, L., Breser, M. L., Porporatto, C., & Agostini, E. (2019). Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138, 26-35.

Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Vargas, L. K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, 63, 15-22.

Bárbaro, I. M., Centurion, M. A. P. C., Gavioli, E. A., Sarti, D. G. P., Bárbaro Júnior, L. S., Ticelli, M., & Miguel, F. B. (2009). Análise de cultivares de soja em resposta a inoculação e aplicação de cobalto e molibdênio. *Revista Ceres*, 56(3), 342-349.

Bomfim, P. R. C. M., Almeida, J. S., Gouveia, V. A. L., Macedo, M. A. S., & Marques, J. A. V. C. (2011). Utilização de análise multivariada na avaliação do desempenho economico-financeiro de curto prazo_uma aplicação no setor de distribuição de energia elétrica. *Revista ADM.MADE*, 15(1), 75-92.

Cerezini, P., Kuwano, B. H., dos Santos, M. B., Terassi, F., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2016). Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. *Field Crops Research*, 196, 160-167.

Chibeba, A. M., Guimarães, M. D. F., Brito, O. R., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2015). Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *American Journal of Plant Sciences*, 06(10), 1641-1649.

Cochran, W. G. (1947). The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics*, 22(11), 47-52.

Córdova, S. C., Castellano, M. J., Dietzel, R., Licht, M. A., Togliatti, K., Martinez-Feria, R., & Archontoulis, S. V. (2019). Soybean nitrogen fixation dynamics in Iowa, USA. *Field Crops Research*, 236, 165-176.

Dhami, N., & Prasad, B. N. (2009). Increase in root nodulation and crop yield of soybean by native *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Journal of Plant Science*, 6, 1-3.

Dodd, I. C., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., & Belimov, A. A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, 157(3), 361-379.

Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2016). Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. *Rhizosphere*, 2, 5-12.

Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). *Stages of soybean development*. Special Report. 87.

Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3), 328.

Gagné-Bourque, F., Mayer, B. F., Charron, J. B., Vali, H., Bertrand, A., & Jabaji, S. (2015). Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. *Plos One*, 10(6), 1-23.

Galindo, F. S., Teixeira Filho, M. C. M., Buzetti, S., Ludkiewicz, M. G. Z., Rosa, P. A. L., & Tritapepe, C. A. (2018). Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. *Revista Brasileira De Engenharia Agricola E Ambiental*, 22(1), 51-56.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*, 2012, 1 - 15.

Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.

Gonçalves, L. C., De Andrade, A. P. C., Ribeiro, G. P., & Seibel, N. F. (2014). Composição química e propriedades tecnológicas de duas cultivares de soja. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, 3(1), 33.

Gonçalves, M. R., Pereira, L. C., Jadoski, C. J., Guilherme, D., & Alves, R. T. B. (2018). Composição químicobromatológica de diferentes subprodutos da soja. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 11(1).

Hungria, M., & Mendes, I. C. (2015). Nitrogen fixation with soybean: biological nitrogen fixation? In F. Bruijn (Ed.), *Biological nitrogen fixation* (pp. 1009-1024). New Jersey: John Wiley & Sons.

Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2015). Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *American Journal of Plant Sciences*, 06(06), 811-817.

Juge, C., Prévost, D., Bertrand, A., Bipfubusa, M., & Chalifour, F. P. (2012). Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Applied Soil Ecology*, 61, 147-157.

Kaiser, H. F. (1958). The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*, 23, 187-200.

Kaschuk, G., Nogueira, M. A., Luca, M. J., & Hungria, M. (2016). Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. *Field Crops Research*, 195, 21-27.

Kolmogorov, A. (1941). Confidence limits for an unknown distribution function. *Annals of Mathematical Statistics*, 12, 461-463.

Lim, J. H., & Kim, S. D. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathology Journal*, 29(2), 201-208.

Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. A., & Watson, C. A. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 155-172.

Lodhi, K. K., Choubey, N. K., Dwivedi, S. K., Pal, A., & Kanwar, P. C. (2015). Impact of seaweed saps on growth, flowering behavior and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *The Bioscan*, 10(1), 479-483.

Marinković, J., Bjelić, D., Tintor, B., Miladinović, V., Đukić, V., & Đorđević, V. (2018). Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(2), 13401-13408.

Masciarelli, O., Llanes, A., & Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiology Research*, 169(7-8), 609-615.

Matoso, S. C. G., & Kusdra, J. F. (2014). Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. *Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental*, 18(6), 567-573.

McCoy, J. M., Kaur, G., Golden, B. R., Orlowski, J. M., Cook, D. R., Bond, J. A., & Cox, M. S. (2018). Nitrogen fertilization of soybean affects root growth and nodulation on two soil types in Mississippi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(2), 181-187.

Mendes, I. C., Vargas, M. A. T., & Hungria, M. (2000). Estabelecimento de Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e seus efeitos na reinoculação da soja em solos de cerrado. *Documentos*, 20 (pp. 18 p.). Planaltina: Embrapa Cerrados.

Mundstock, C. M., & Thomas, A. L. (2005). *Soja: Fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos*. Porto Alegre: Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul : Evangraf.

Mustafa, S., Kabir, S., Shabbir, U., & Batool, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis*, 78(2), 115-123.

Narayanan, S., & Fallen, B. (2019). Evaluation of Soybean Plant Introductions for Traits that can Improve Emergence under Varied Soil Moisture Levels. *Agronomy*, 9(3), 118.

Neisse, A. C., & Hongyu, K. (2016). Aplicação de componentes principais e análise fatorial a dados criminais de 26 estados dos EUA. *Engineering and Science*, 5(2), 105-115.

Novinscak, A., Joly, D. L., & Fillion, M. (2019). Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* LBUM677. *Microbiol Resources Announcements*, 8(25), 1-2.

Peiretti, P., Karamać, M., Janiak, M., Longato, E., Meineri, G., Amarowicz, R., & Gai, F. (2019). Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Plant during Growth Cycle. *Agronomy*, 9(3), 153.

Pérez-Montaña, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jimenez-Guerrero, I., Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res*, 169(5-6), 325-336.

Pimentel, I. C., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R. M., & Azevedo, J. L. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5), 705-711.

Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.

Rego, C. H. Q., Cardoso, F. B., Cândido, A. C. d. S., Teodoro, P. E., & Alves, C. Z. (2018). Co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* increases yield and quality of soybean seeds. *Agronomy Journal*, 110(6), 2302.

Rotaru, V. (2015). Responses of acid phosphatase activity on the root surface and rhizospheric soil of soybean plants to phosphorus fertilization and rhizobacteria. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, LVIII, 295-300.

Saikia, S. P., Dutta, S. P., Goswami, A., Bhau, B. S., & Kanjilal, P. B. (2010). Role of *Azospirillum* in the improvement of legumes. In M. S. Khan, A. Zaidi & J. Musarrat (Eds.), *Microbes for legume improvement* (pp. 389-408). Springer-Verlag, Wien.

Saito, A., Tanabata, S., Tanabata, T., Tajima, S., Ueno, M., Ishikawa, S., Ohyama, T. (2014). Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Int J Mol Sci*, 15(3), 4464-4480.

Salvagiotti, F., Cassman, K. G., Specht, J. E., Walters, D. T., Weiss, A., & Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research*, 108(1), 1-13.

Salvagiotti, F., Specht, J. E., Cassman, K. G., Walters, D. T., Weiss, A., & Dobermann, A. (2009). Growth and nitrogen fixation in high-yielding soybean: Impact of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal*, 101(4), 958.

Sandini, I. E., Belani, R. B., Falbo, M. K., Pacentchuk, F., & Huzar-Novakowski, J. (2019). Seed treatment and pre-inoculation of soybean: effect of storage period and agrochemicals on

the physiological quality of seed and yield. *African Journal of Agricultural Research*, 14(3), 151-160.

Santachiara, G., Borrás, L., Salvagiotti, F., Gerde, J. A., & Rotundo, J. L. (2017). Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. *Plant and Soil*, 418(1-2), 191-203.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda Mdel, C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res*, 183, 92-99.

Shabanamol, S., Divya, K., George, T. K., Rishad, K. S., Sreekumar, T. S., & Jisha, M. S. (2018). Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). *Physiol Mol Plant Pathol.*, 102, 46-54.

Shen, Y., Sui, P., Huang, J., Wang, D., Whalen, J. K., & Chen, Y. (2018). Global warming potential from maize and maize-soybean as affected by nitrogen fertilizer and cropping practices in the North China Plain. *Field Crops Research*, 225, 117-127.

Silva, F. C. (2009). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. (2a ed.), rev. ampl. - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.

Smirnov, N. V. (1948). Table for estimating the goodness of fit empirical distributions. *Annals of Mathematical Statistics*, 19(279-281).

Spolaor, L. T., Gonçalves, L. S. A., Santos, O. J. A. P. d., Oliveira, A. L. M. d., Scapim, C. A., Bertagna, F. A. B., & Kuki, M. C. (2016). Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. *Bragantia*, 75(1), 33-40.

Steiner, F., Ferreira, H. C. P., & Zuffo, A. M. (2019). Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield? *Semina: Ciências agrárias*, 40(1), 81.

Szilagyi-Zecchin, V. J., Marriel, I. E., & Silva, P. R. F. (2017). Produtividade de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de nitrogênio cultivado em campo no Brasil. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(4), 795-798.

Zafar, M., Abbasi, M. K., Khan, M. A., Khaliq, A., Sultan, T., & Aslam, M. (2012). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions. *Pedosphere*, 22(6), 848-859.

Zuffo, A. M., Steiner, F., Busch, A., & Zoz, T. (2018). Response of early soybean cultivars to nitrogen fertilization associated with *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 48(4), 436-446.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Fabiano Pacentchuk – 25%

Juliana Marcolino Gomes - 10%

Vanderlei Aparecido de Lima – 15%

Marcelo Cruz Mendes – 10%

Itacir Eloi Sandini – 20%

Sidnei Osmar Jadoski – 20%