

OPEN ACCESS

Editado por:

Dr. Vinicius Batista Campos

Instituto Federal da Paraíba, Princesa
Isabel-PB, Brasil

Seção:

Esse artigo foi submetido em Ciências
Agrárias, uma seção do Journal
Bioenergy and Food Science

ID JBFS1462017

DOI 10.18067/jbfs.v5i2.146

Processo de revisão:
Prot. 1462017R01 (Brasil)
Prot. 1462018R02 (Brasil)*Autor para correspondência:
Daisy Parente Dourado
daisyagro@gmail.comConflito de interesse
Os autores declararam que não há
conflito de interesse.Financiamento:
Os autores declararam que não
houve financiamento para o
desenvolvimento da pesquisa.

Recebido em: 27 de janeiro 2017

Aceito em: 21 de agosto 2018

Publicado em: 15 de setembro 2018

Citação:
Dourado, D. P., Pelúzio, J. M., Reina,
E., Albernás, K. K., Lázari, T. M. de, &
Muraishi, C. T. (2018). Teor de
proteína em grãos de *Glycine max*
influenciados pela inoculação mista
de *Bradyrhizobium japonicum* e
Azospirillum brasilense. *Journal of
Bioenergy and Food Science*, 5(2), 32-
43. doi: 10.18067/jbfs.v5i2.146JBFS all rights
Copyright: © 2018**Teor de proteína em grãos de *Glycine max* influenciados pela inoculação mista de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense****Protein content in Glycine max grains influenced by the mixed inoculation of Bradyrhizobium japonicum and Azospirillum brasilense*

1,* Daisy Parente DOURADO, 1, Joenes Mucci PELÚZIO, 1, Evandro REINA,

1, Kayo Kennedy ALBERNAS, 1, Thiago Magalhães de LÁZARI e 1, Cid Tacaoca MURAISHI

1Universidade Federal do Tocantins, Campus Gurupi. Rua Badejós, Lote 7, Chácaras 69/72, Zona Rural. CEP: 77402-970. Gurupi-TO, Brasil.

RESUMO

A soja é valorizada sobretudo por possuir altos teores de proteína quando comparada a outras culturas. Entretanto, tem sido comum observar materiais genéticos produzidos com teores de proteína cada vez menores, fato este que desagrada principalmente aos fabricantes de ração animal. Objetivou-se avaliar a influência do *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* nos teores de proteína dos grãos de soja, cultivada sob baixa latitude. O delineamento experimental utilizado foi de em blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 5, com duas cultivares (TMG 1288 RR e M 9144 RR) e cinco doses de *Azospirillum brasilense* (0, 100, 200, 300 e 400 mL ha⁻¹). A avaliação foi realizada no estádio R8 onde as amostras foram trilhadas, pesadas e moídas e avaliado o teor de proteína dos grãos (%). O uso misto do *B. japonicum* via semente e *A. brasilense* via foliar, propiciaram aumento nos teores de proteína, em todas as épocas de plantio e cultivares. Temperaturas altas e baixas precipitações contribuíram para o aumento dos teores de proteína dos grãos, quando na presença do *Azospirillum*, sobretudo influenciados pelas condições ambientais e fatores genéticos, mas também aos fatores nutricionais que são metabolizados pela planta e assimilados na forma de reservas no grão, em razão da aplicação da bactéria associativa.

Palavras-chave: Inoculante. Incremento proteico. Fitohormônios. Restrição hídrica. Soja.

ABSTRACT

Soy is mainly valued for high protein content when compared to other crops. However, it had been common to visit genetic materials with the same lower and lower protein levels, a fact that mainly displeased animal feed manufacturers. The objective of this study was to evaluate *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium japonicum* on the protein content of soybeans, grown under low latitude. The experimental design was a randomized complete block design with two cultivars (TMG 1288 RR and M 9144 RR) and five doses of *Azospirillum brasilense* (0, 100, 200, 300 and 400 mL ha⁻¹). The evaluation was performed at the R8 stage, where the heavy, weighted and measured variables and the protein content of the grains (%) were analyzed. The mixed use of *B. japonicum* via seed and *A. brasilense* via foliar caused an increase in protein levels, in all planting seasons and cultivars. High and precipitated low temperatures contributed to the increase of grain protein contents, when in the presence of *Azospirillum*, excess of cultures by environmental parameters and genetic factors, but also for the nutritional factors that are metabolized by the plant and assimilated in the form of reserves without grain, due to the application of associative bacteria.

Keywords: Inoculant. Protein increase. Phytohormones. Water restriction. Soybean.

INTRODUÇÃO

No cenário produtivo atual, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, com um volume de produção de 96,5 e 106,96 milhões de toneladas nas safras 2015/2016, respectivamente (Freiria, 2016).

A soja é o principal produto de exportação do agronegócio no país, configurando-se em uma “commodity” bastante expressiva para o mercado, cujos grãos são valorizados pelos teores de proteína (Kaschuk et al., 2013).

A proteína de soja tem sido usada para alimentação humana, ração animal, como adubo, fabricação de fibras, revestimentos, fabricação de papel e emulsão de água para tintas (Sales et al., 2016). Os autores afirmam que o alto valor econômico do cultivo deve-se sobretudo, ao alto teor proteico (40% em média), aliado a uma alta produtividade de grãos (3.000 kg ha⁻¹ em média).

Entretanto, para alcançar elevadas produtividades o sistema produtivo da soja tem exigido cada vez mais o emprego de fontes nitrogenadas, oriundas em sua maioria na forma mineral. A soja é altamente dependente da disponibilidade de nitrogênio (N), o qual é majoritariamente suprido pela fixação biológica de N (FBN), realizada por bactérias conhecidas como rizóbios, sendo necessário o uso de inoculantes ou fertilizantes nitrogenados para atender as exigências da cultura (Kaschuk et al., 2010a; 2010b).

Embora o uso de *Bradyrhizobium* seja um dos principais impulsionadores do cultivo em larga escala no Brasil (ZUFFO et al., 2015), faz-se necessário diversificar os sistemas de manejo produtivo da cultura por meio de tecnologias que substituam os insumos minerais por organismos biológicos, afim de suprir as necessidades nutricionais de forma sustentável. Hungria, Nogueira e Araújo (2013), afirmam que em função das condições abióticas atuais e potenciais benefícios da FBN na soja, a associação de microrganismos dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* podem melhorar o desempenho de plantas leguminosas.

Dentre as regiões produtoras da leguminosa, o Estado de Tocantins tem ganhado destaques nacional e internacional devido à expansão de sua fronteira agrícola, principalmente por apresentar condições climáticas favoráveis e localização geográfica privilegiada (Campos et al., 2016).

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do *Azospirillum* associado ao *Bradyrhizobium* nos teores de proteína dos grãos de cultivares soja, em três épocas de semeadura em região de baixa latitude.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano agrícola 2015/16 foram realizados três experimentos correspondentes a três épocas de semeadura com a cultura da soja, na estação experimental da Universidade Federal do Tocantins (UFT) no município de Palmas - TO, localizado na latitude 10°45' S, longitude 47°14' W a 220 m de altitude, com semeaduras realizadas em 18/11/2015, 02/12/2015 e 17/12/2015.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Amarelo Distroférico, e textura média argilosa (Embrapa, 2013). Os resultados da análise química de material de solo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo na camada 0-20 cm para o solo Latossolo Amarelo Distroférico, antes da implantação da *Glycine max*, em Palmas-TO, Safra 2015/16.

Table 1. Results of chemical analysis of the soil in the 0-20 cm layer for latosol Yellow Distroferric before deployment *Glycine max*, Palmas-TO, Crop 2015/16.

pH ¹	M.O.	P ²	K	Ca ³	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
H ₂ O	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----cmolc dm ⁻³ -----						%	
5,65	10,49	17,28	0,25	1,50	0,76	0,00	1,50	2,51	4,01	62,59
	Argila (g Kg ⁻¹)			Silte (g Kg ⁻¹)				Areia (g Kg ⁻¹)		
	199			393				408		

(1): CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; (2): Extrator Mehlich; (3) KCl 1 mol L⁻¹

(1): CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; (2): Mehlich extractor; (3) KCl 1 mol L⁻¹

Segundo a classificação internacional de Köppen, o clima da região é do tipo C2wA'a' - Clima úmido subúmido. Os dados climáticos coletados durante o período de condução dos ensaios experimentais, mostram que no ano agrícola 2015/2016 o volume de precipitação foi relativamente baixo quando comparado ao volume médio da região para o mesmo período nas safras anteriores (Figura 1). Para as condições de cultivo da soja, segundo a CONAB (2016), durante o ciclo da oleaginosa as condições climáticas foram consideradas as mais severas dos últimos anos, caracterizada por irregularidades e escassez das chuvas, com temperaturas acima da média para o período.

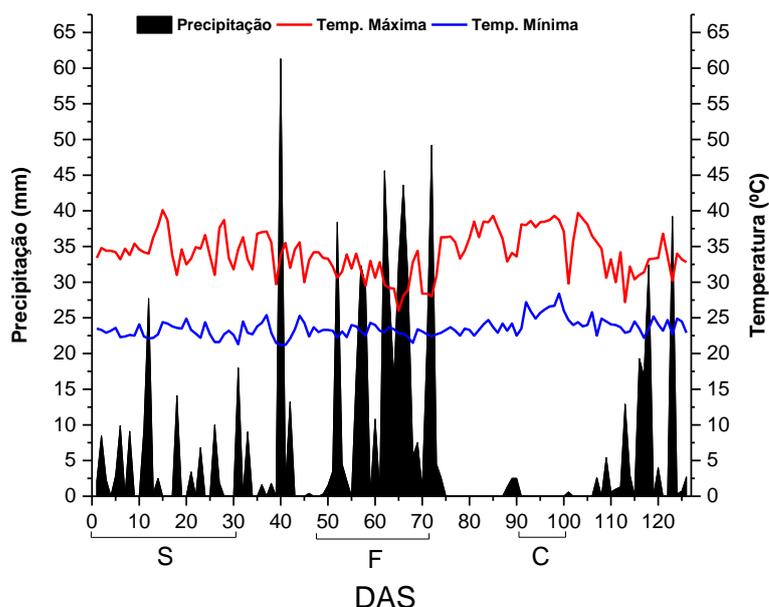


Figura 1. Dados climáticos da precipitação pluvial, temperaturas máximas e mínimas ocorridas durante o período experimental de novembro de 2015 a março de 2016 em Palmas, TO. Fonte: Dados do INMET (2016). S: semeadura; F: florescimento; C: colheita; DAS: dias após a semeadura.

Figure 1. Climatic data of rainfall, maximum and minimum temperatures during the experimental period from November 2015 to March 2016 in Palmas, TO. Source: INMET data (2016). S: seeding; F: flowering; C: harvest; DAS: days after sowing.

Em todos os experimentos, realizou-se na semeadura a inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* como é de praxe sua aplicação e uso em sementes de soja. Em estágios posteriores de desenvolvimento, aplicou-se o *Azospirillum brasilense* de forma fracionada na parte aérea das mesmas plantas inoculadas via sementes.

O delineamento experimental utilizado, em cada ensaio, foi em blocos casualizados com dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2x5, representados por duas cultivares (TMG 1288 RR e M 9144 RR) e cinco doses de *Azospirillum brasilense* (0, 100, 200, 300 e 400 mL ha⁻¹) do produto comercial GRAP NO, estirpes AbV5 e AbV6, sendo metade aplicada no estágio V2 (primeira folha trifoliolada) e metade no estágio R1 (início da floração).

Com relação ao manejo de pré-semeadura, noventa dias antes da instalação do primeiro experimento realizou-se a calagem do solo, com a aplicação de 1,0 t ha⁻¹ de calcário calcítico (PRNT 85), incorporado ao solo, visando a elevação da saturação por bases acima de 60%.

Para a semeadura, foram realizadas as operações de aração, gradagem e sulcamento da área de forma mecânica. A semeadura e a adubação no sulco foram realizadas manualmente para garantir a precisão das quantidades aplicadas de adubo. De acordo com a análise de solo, foram utilizados 80 kg ha⁻¹ de fósforo na forma de superfosfato triplo e 100 kg ha⁻¹ de potássio na forma de cloreto de potássio, sendo o fósforo aplicado no plantio e o potássio nos estágios V2 e V4.

A inoculação das sementes foi realizada com inoculante líquido sob os sulcos de plantio com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 e 5080 na proporção a dose recomendada para o tratamento via sementes (60g/50kg de semente). A densidade de semeadura foi de 15 sementes por metro linear.

A parcela experimental foi constituída por quatro linhas de plantas com 5,0 m de comprimento, espaçadas em 0,5 m. As avaliações foram realizadas nas duas linhas centrais, excluindo 0,5 m das extremidades de cada linha, totalizando 4,0 m² de área útil.

O controle de plantas daninhas em pós-emergência foi realizado utilizando-se glifosato® na dosagem de 2 L ha⁻¹. Utilizou-se para aplicação pulverizador costal, com bicos do tipo leque adotando volume de calda de 200 L ha⁻¹.

A colheita foi realizada uma semana após as plantas terem apresentado 95% das vagens maduras, nas três épocas de semeadura, ou seja, no estágio R8 da escala de Fehr et al. (1971), onde realizou-se o dessecamento com Paraquat, na dosagem de 1,5 L ha⁻¹. Posteriormente, as vagens foram colhidas manualmente nas duas fileiras centrais de cada parcela e identificadas. Em seguida, foram trilhadas, sendo os grãos pesados (kg ha⁻¹), acondicionados em saco de papel e transportados para o Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos - LACIMP da Universidade Federal do Tocantins – Palmas, TO.

Retirou-se três amostras por cada cultivar, dose e experimento, onde os grãos foram moídos e posteriormente pesados em balança de precisão para determinar o teor de proteína dos grãos (%), conforme metodologia proposta por Kjeldahl (1883). Este método consiste na obtenção do nitrogênio total da amostra no qual é convertido para proteína bruta por meio do fator 6,25 (referente aos cereais e oleaginosas), utilizando 0,5 gramas por amostra do material seco e moído.

Após a obtenção dos dados, foi realizada a análise de variância individual e posteriormente a análise conjunta dos ensaios, em que o menor quadrado médio residual não diferiu em mais de sete vezes do maior (Cruz, Regazzi & Carneiro, 2014).

Os dados de cada experimento foram submetidos ao teste de normalidade de KOLMOGOROV- SMIRNOV, sendo as análises estatísticas realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR 5.0 (Ferreira, 2011).

As médias dos tratamentos (épocas de semeadura e das cultivares), foram comparadas pelo critério de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Para as doses de *Azospirillum brasilense*, em cada cultivar, foram realizadas análises de regressão, através do uso de

polinômios ortogonais, e uma vez estabelecida a relação funcional entre as doses e o genótipo foi determinada a equação de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância conjunta (Tabela 2), realizada após detectar homogeneidades entre as variâncias dos erros experimentais para todas as características, foi detectado, dentre outros, efeito significativo para a interação tripla época de semeadura x doses de *Azospirillum brasilense* x cultivares, indicando comportamento diferencial dos cultivares, em função das épocas de semeadura e das doses utilizadas. Assim, foram realizados os desdobramentos.

Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta das características: teor de proteína, teor de óleo, rendimento de proteína e rendimento de óleo (kg ha^{-1}), em duas cultivares de *Glycine max* submetidas a doses *Azospirillum brasilense* (mL ha^{-1}), aplicada via foliar, em três épocas de semeadura. Palmas-TO, Safra 2015/16.

Table 2. Summary of the analysis of variance of characteristics: protein content, oil content, protein yield and oil yield (kg ha^{-1}) in two *Glycine max* cultivars subjected to measure of *Azospirillum brasilense* measure (ml ha^{-1}) applied via foliar, in three sowing times. Palmas-TO, Crop 2015/16.

FV ¹	GL ²	Quadrado Médio Proteína (%)
Época (a)	2	72,677*
Bloco	2	0,1283 ^{ns}
Resíduo (a)	4	1,1027
Cultivares (b)	1	0,017 ^{ns}
Cultivares x Época	2	30,050*
Resíduo (b)	6	2,4902
Doses (c)	4	98,916*
Época x Doses	8	62,139*
Cultivar x Doses	4	37,172*
Época x Doses x Cultivar	8	22,794*
Resíduo (c)	46	1,1923
MÉDIA		40,228
CV ³ %(a)		2,61
CV %(b)		3,92
CV %(c)		2,71

(¹): Fontes de variação; (²): Graus de liberdade; (³): coeficiente de variação.

(*): significativo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade; (^{ns}): não-significativo.

(¹): Sources of variation; (2): Degrees of freedom; (3): coefficient of variation.

(*): significant by the Scott-Knott test at 5% probability; (ns): non-significant.

Os coeficientes de variação foram baixos, variando de 2,61 a 3,92%, indicando boa precisão do experimento. Estes resultados estão de acordo com os observados por Pinheiro et al. (2013), que obtiveram coeficientes de variação relativos aos teores de proteína entre 2,2 e 3,0%, onde afirmam que, valores fenotípicos do teor de proteína são estimados, em geral, com alta precisão experimental.

Os resultados apresentados na Tabela 3, mostram que a segunda e terceira época de semeadura (02/12 e 17/12) propiciaram maiores teores de proteína,

independentemente das doses de *Azospirillum brasilense* empregadas. Nestas épocas, M 9144RR apresentou maior teor proteico nas menores doses, em 02/12, e TMG 1288RR na maior dose, em 02/12, e em praticamente todas as doses, em 17/12.

Tabela 3. Teor médio de proteína nos grãos de soja (duas cultivares), cultivadas em três épocas de semeadura e submetidas a doses de *Azospirillum brasilense* (mL ha⁻¹), em Palmas-TO, Safra 2015/16.

Table 3. Average protein content in soybean grains (two cultivars), cultivated at three sowing times and submitted to measure of *Azospirillum brasilense* (mL ha⁻¹), in Palmas-TO, Crop 2015/16.

Doses (mL.ha ⁻¹)	18/11		02/12		17/12	
	TMG 1288	M 9144	TMG 1288	M 9144	TMG 1288	M 9144
	%					
0	35,90 bC1	35,60 bC1	37,97 aC2	45,30 aA1	35,30 bD1	33,20 cC2 ¹
100	36,65 bC1	36,54 bC1	39,86 aB2	41,82 aB1	40,14 aC1	34,13 cC2 ²
200	43,15 aA1	42,39 aA1	42,60 aA1	43,63 aA1	42,99 aB1	34,40 bC2 ³
300	36,53 bC2	40,38 cB1	41,36 aA1	42,44 bB1	42,24 aB2	50,10 aA1
400	39,62 cB1	39,00 bB1	42,02 bA1	39,67 bC2	46,86 aA1	45,00 aB2
Média	38,37	38,78	40,76	42,57	41,50	39,36

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, entre as épocas de semeadura em cada dose e em cada cultivar, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. ²Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, entre as doses de *A. brasilense*, em cada época e em cada cultivar, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. ³Médias seguidas pelo mesmo número, na linha, entre as cultivares, em cada época e em cada dose, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

¹Average followed by the same lowercase letter in the row between sowing times at each dose and in each cultivar do not differ from each other to a 5% probability by the Scott-Knott test. ² Average followed by the same capital letter in the column between the doses of *A. brasilense* at each season and in each cultivar do not differ among themselves at 5% probability by the Scott-Knott test. ³ Average followed by the same number in the row between the cultivars at each time and at each dose do not differ from each other to a 5% probability by the Scott-Knott test.

Os resultados de precipitação e temperatura (Figura 1), mostram que os plantios realizados na segunda e terceira época sofreram maiores restrições hídricas no período reprodutivo das cultivares, aliada às altas temperaturas na fase de enchimento de grãos em relação à primeira época de plantio, que sofreu picos de veranicos apenas durante o estágio vegetativo. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Bewley e Black (1985), Marcos Filho (2005), Albrecht et al. (2008) e Lopes, Peluzio e Martins (2016).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as alterações na composição química das sementes quando submetidas a condições de déficit hídrico. Albrecht et al. (2008) afirma que a variação das condições climáticas pode acarretar em distúrbios bioquímicos na biossíntese de proteínas e que, possivelmente, deve afetar outras macromoléculas, estendendo-se, provavelmente, a influência na síntese de vários outros compostos, ou primários ou secundários.

Em cada época de semeadura as cultivares apresentaram comportamento diferenciado (Tabela 3), com uma variação expressa nos teores de proteína, que está associada à genética de cada um. Segundo Cavatte et al. (2011), a genética de cada

material pode promover resposta adaptativa quando as mesmas são submetidas às condições de seca, tornando-as sensíveis ou não à estas condições.

Os resultados obtidos superam os encontrados por Lopes, Peluzio e Martins (2016), que em experimento realizado na mesma região, em condições normais de cultivo, obtiveram 30% de proteína com a TMG 1288RR e 37,5% com a M 9144RR na semeadura em 01/12. Em semeaduras realizadas em 17/12, os autores encontraram 35,1% na TMG 1288RR e 36,5% na M 9144RR. Esse aumento não está associado somente as condições ambientais e fatores genéticos, mas também aos fatores nutricionais que são metabolizados pela planta e assimilados na forma de reservas no grão, indicando influência do *Azospirillum brasilense* aplicada via foliar.

Como houve relação funcional entre as doses de *Azospirillum brasilense* aplicadas, foram ajustados modelos de regressão para as duas cultivares, em cada época de semeadura. Para a TMG 1288RR, foram ajustadas regressões lineares para a primeira (18/11) (figura 2a) e terceira época (17/12) (figura 2c), indicando incremento no teor de proteína dos grãos com aumento das doses de *Azospirillum brasilense*. Na segunda época (02/12) (figura 2b) foi ajustado modelo quadrático, onde os conteúdos de proteína atingiram sua máxima eficiência técnica (MET) de 312,31 mL ha⁻¹, correspondente a um teor de 43,81 %, com decréscimo da curva a partir de dosagens superiores (Figura 2).

Assim, para os modelos lineares, as doses utilizadas no presente estudo não foram suficientes para que as cultivares alcançassem o máximo teor de proteína nos grãos.

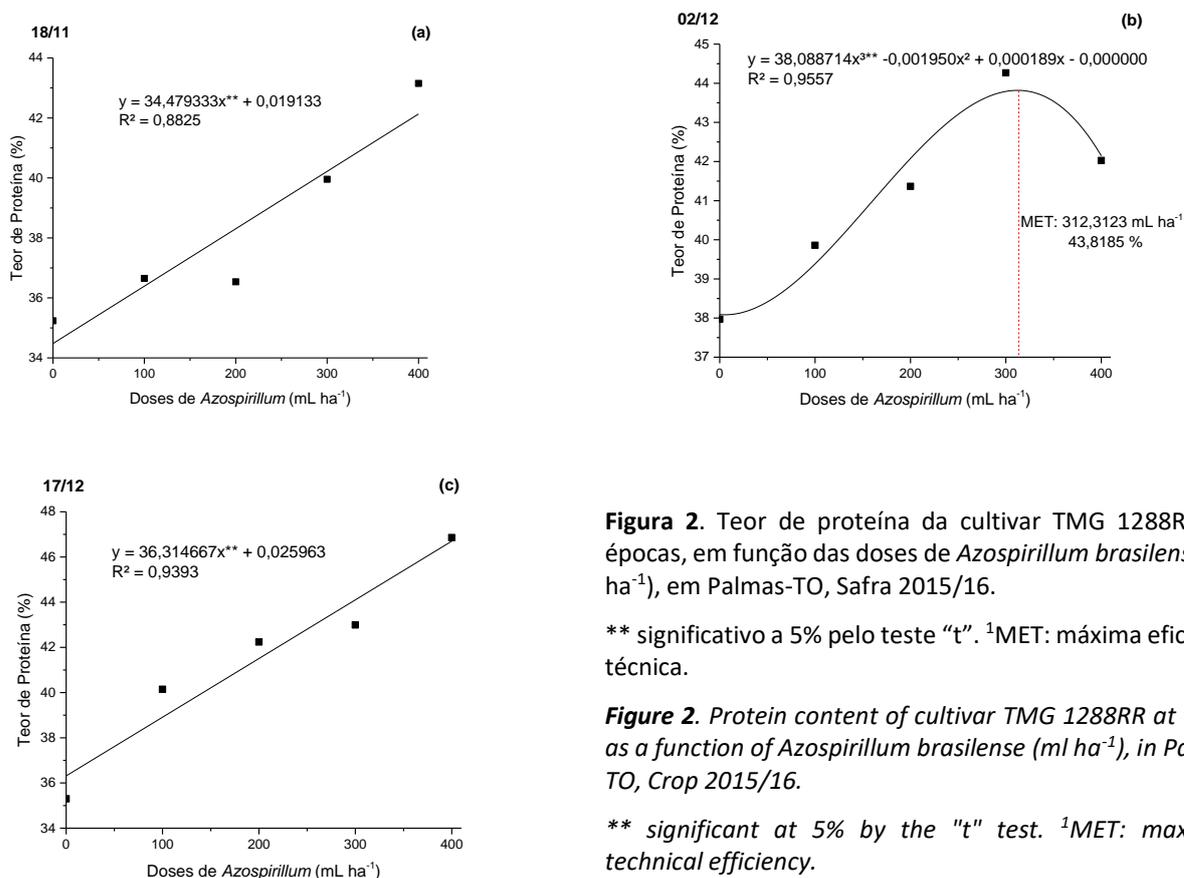


Figura 2. Teor de proteína da cultivar TMG 1288RR nas épocas, em função das doses de *Azospirillum brasilense* (mL ha⁻¹), em Palmas-TO, Safra 2015/16.

** significativo a 5% pelo teste "t". ¹MET: máxima eficiência técnica.

Figure 2. Protein content of cultivar TMG 1288RR at times, as a function of *Azospirillum brasilense* (ml ha⁻¹), in Palmas-TO, Crop 2015/16.

** significant at 5% by the "t" test. ¹MET: maximum technical efficiency.

Na figura 3, nota-se que a cultivar M 9144RR apresentou, nas três épocas de semeadura, resposta crescente do teor de proteína nos grãos com o aumento nas doses de *Azospirillum brasilense*. Os resultados revelam que os teores de proteína foram fortemente influenciados pela pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* em consonância com o *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via semente, com valores crescentes quando comparado ao tratamento controle (ausência do *Azospirillum brasilense*). Além disso, os incrementos foram maiores em semeaduras mais tardias, onde as condições climáticas foram as mais severas (Figura 1).

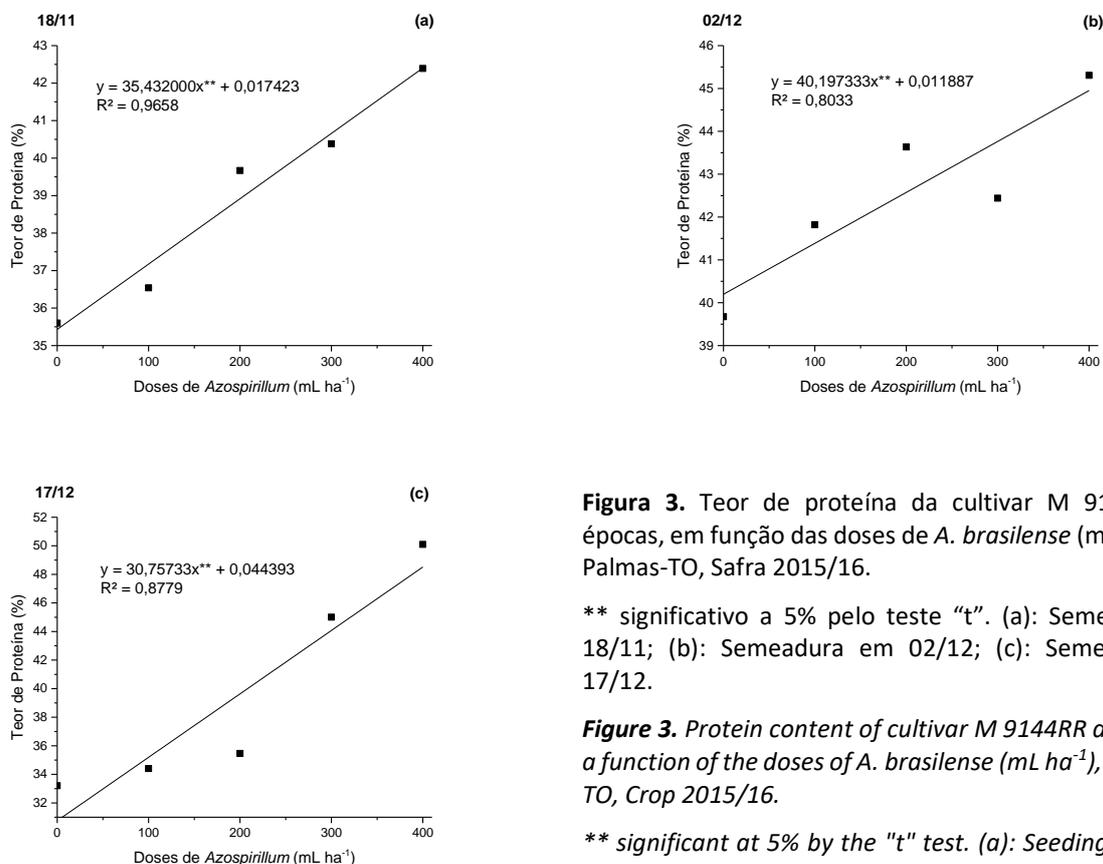


Figura 3. Teor de proteína da cultivar M 9144RR nas épocas, em função das doses de *A. brasilense* (mL ha⁻¹), em Palmas-TO, Safra 2015/16.

** significativo a 5% pelo teste "t". (a): Semeadura em 18/11; (b): Semeadura em 02/12; (c): Semeadura em 17/12.

Figure 3. Protein content of cultivar M 9144RR at times, as a function of the doses of *A. brasilense* (mL ha⁻¹), in Palmas-TO, Crop 2015/16.

** significant at 5% by the "t" test. (a): Seeding of 18/11; (b): Seeding of 02/12; (c): Seeding of 17/12.

O incremento do teor de proteína com o aumento das doses de *Azospirillum brasilense*, em grãos previamente inoculados com *Rhizobium*, pode estar associado associada ao maior acúmulo de N na fase de maior demanda pela cultura deste elemento (fase reprodutiva) (Cerezini et al., 2016), da maior absorção de N pelas raízes das plantas (Saubidet et al., 2002) ou de uma série de mecanismos favoráveis, tais como a produção de fitormônios (Hungria, Nogueira & Araújo, 2015).

Durante o crescimento e desenvolvimento de culturas de soja, há alguns períodos críticos relacionados com o N proveniente da FBN pelo *Bradyrhizobium japonicum*. Entre estes estão os estágios reprodutivos R3 (formação inicial de vagens) e R5 (enchimento precoce de grãos), que requerem altos níveis de fotossíntese e podem resultar em senescência nodular (Fehr et al., 1971). Como as aplicações foliares possui uma assimilação com menor custo metabólico, possivelmente sua ação foi

potencializada a partir dos sinais de estresses da planta, seja por deficiência hídrica ou diminuição dos nódulos.

Em condições de deficiência hídrica, a FBN pode ser comprometida, principalmente quando ocorridas nas etapas-chave de nodulação durante o desenvolvimento da cultura no campo. Como as aplicações de *Azospirillum brasilense* no presente estudo ocorreram em V2 e R1 e logo em seguida houveram picos de nodulação, o fornecimento de N via inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ter aumentado a eficiência da nodulação, refletindo em maior translocação de assimilados para os grãos.

Considerando que as aplicações de *Azospirillum brasilense* foram realizadas via foliar, e a maioria dos trabalhos chamam atenção para o desenvolvimento do sistema radicular e FBN, possivelmente o incremento dos teores proteicos pode ter sido oriundo da produção de hormônios reguladores ou do fornecimento de nutrientes para a planta.

De acordo com Van Huizen et al. (1996), o ácido cloroindol-3-acético, auxina endógena em frutos de ervilha, induz a síntese de proteínas. Galindo et al. (2016) avaliando a aplicação de *Azospirillum brasilense* via sementes no milho concluíram que o uso de 200 mL ha⁻¹ promoveu aumento no índice de clorofila e na concentração de P nas folhas.

Portugal et al. (2016) em aplicação via foliar de *Azospirillum brasilense* no estágio V6 da soja, verificaram que a inoculação causou diminuição na massa de matéria seca, devido uma maior translocação de massa para os grãos do que para a planta. Para isso, a atuação do *Azospirillum brasilense* influenciou no processo de formação das sementes, exercendo mecanismos de tolerância a seca, possivelmente por meio de hormônios específicos, além de promover o acúmulo de material de reserva no grão.

Em trabalho *in vitro* realizado por Nascimento e Mosquin (2004), verificaram que as sementes de soja podem conter citocininas que estimulam o transporte de assimilados às sementes, além de causar expansão celular na extensibilidade da parede celular (Taiz & Zeiger, 2002). Os autores relatam que a citocinina é um fitohormônio que influencia a produção de proteínas em grãos de soja.

Outra hipótese que pode ser levantada, está na atuação do ABA (ácido abscísico) devido a ocorrência de um déficit hídrico, é provável que o uso da bactéria potencializou sua atividade, fazendo com que a planta conviva com os fatores de estresses e promovendo recuperação mais eficiente após a perturbação. Embora as informações que relatem a identificação de ABA em cultivos com *Azospirillum brasilense* sejam escassas, sabe-se que os níveis de ABA da planta aumentam em resposta ao déficit hídrico, além de desempenhar um papel chave no fechamento estomático e na indução de vários genes induzidos pelo déficit hídrico (Dodd et al., 2010).

Segundo Cohen et al. (2008) o *Azospirillum brasilense* promove aumento significativos do nível de ABA. Contudo, não se pode afirmar, com certeza, se o ABA produzido é oriundo da bactéria ou da planta.

CONCLUSÃO

O uso misto do *Bradyrhizobium japonicum* via semente e *Azospirillum brasilense* via foliar propiciaram aumento nos teores de proteína, em todas as épocas de plantio e cultivares.

Doses crescentes de *Azospirillum brasilense* promoveram aumento no teor de proteína, com destaque para a aplicação foliar de 200 mL ha⁻¹ que proporcionou maiores teores de proteína nas primeiras épocas, enquanto que em semeaduras tardias necessitou da aplicação de 300 a 400 mL ha⁻¹.

Temperaturas altas e baixas precipitações contribuíram para o aumento dos teores de proteína dos grãos, quando na presença do *Azospirillum brasilense*, sobretudo influenciados pelas condições ambientais e fatores genéticos, mas também aos fatores nutricionais que são metabolizados pela planta e assimilados na forma de reservas no grão, em razão da aplicação da bactéria associativa.

A utilização do *Azospirillum brasilense* via foliar em plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium japonicum* em soja poderá agregar valor proteico aos produtos alimentícios.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado, substancial para a execução desta pesquisa.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Elaboração do manuscrito, condução do experimento e análises estatísticas: Autores DPD, JMP e ER; Elaboração do manuscrito e condução do experimento: Autor DPD e KKA; Revisão de literatura, condução do experimento e análises estatísticas: TML e CTM; Revisão final do artigo: Autor DPD.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declararam que não há conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Os autores declararam que não houve financiamento para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Albrecht, L. P., Braccini, A. L., Ávila, M. R., Suzuki, L. S., Scapim, C. A., & Barbosa, M. C. (2008). Teores de óleo, proteínas e produtividade de soja em função da antecipação da semeadura na região oeste do Paraná. *Bragantia*, 67(4), 865-873. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000400008>
- Bewley, J. D., & Black, M. (1985). *Seeds: Physiology of Development and germination*. New York: Plenum Press, 367p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1747-4>
- Campos, L. J. M., Costa, R. V., Almeida, R. E. M., & Simon, J. (2016). Desempenho de cultivares de soja na safra 2015/2016. Informativo Técnico: Fronteira Agrícola nº10. Núcleo de Sistemas Agrícolas da Embrapa Pesca e Aquicultura, 2016.
- Cavatte, P. C., Martins, S. C. V., Morais, L. E., Silva, P. E. M., Souza, L. T., & Matta, F.M. da. A fisiologia dos estresses abióticos. In: FRITSCHÉ-NETO, R., BORÉM, A. Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. cap.3, p.39-47. PMID:21939445
- Cerezini, P., Kuwano, B., Santos, M., Terassi, F., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2016). Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. *Field Crops Research*, 196(1), p.160-167, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.06.017>

- Cohen, A. C., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2008). Azospirillum brasilense Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*, 54(3), 97-103, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9>
- Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. Monitoramento agrícola (2016). Acompanhamento da safra brasileira Grãos, v. 4 Safra 2016/17-Oitavo levantamento, Brasília, maio 2017. Recuperado de http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_12_10_37_57_boletim_graos_maio_2017.pdf
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., & Carneiro, P. C. S. (2014). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 514 p.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x>
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2013). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Solos, 353 p.
- Fehr, W. R., Caviness, R. E., Burmood, D. T., Pennington, J. S. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* L. Merrill. *Crop Science*, 11(6), 929-931. <https://doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100060051x>
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Freiria, G. H., Lima, W. F., Leite, R. S., Mandarino, J. M. G., Silva, J. B., & Prete, C. E. C. (2016). Productivity and chemical composition of food-type soybeans sown on different dates. *Acta Scientiarum, Agronomy*, 38(3), 371-377. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.28632>
- Galindo, F. S., Teixeira Filho, M. C. M., Buzetti, S., Santini, J. M. K., Alves, C. J., Nogueira, L. M., Ludkiewicz, M. G. Z., Andreotti, M., & Bellotte, J. L. M. (2016). Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 40(1), 1-18. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150364>
- Hungria, M., Nogueira, M.A., & Araujo, R.S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, 49(7), 791-801. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>
- 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*, 6(6), 811-817. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>
- Kaschuk, G., Leffelaar, P. A., Giller, K. E., Alberton, O., Hungria, M., & Kuyper, T. W. (2010a). Responses of grain legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. *Soil Biology & Biochemistry*, 42(1), 125-127. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.017>
- Kaschuk, G., Hungria, M., Leffelaar, P. A., Giller, K. E., & Kuyper, T. W. (2010b). Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. *Plant Biology*, 12(1), 60-69. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00211.x>
- Kaschuk, G., Horst, R., Santos, M. A., Colauto, G. A. L., & Alberton, O. (2013). Relações prováveis entre nodulação, parte aérea e clorofila de variedades de soja com diferentes teores de proteína e óleo nos grãos. *Journal of Agronomic Sciences*, 2(1), 170-178, 2013.
- Lopes, J. A. M., Peluzio, J. M., Martins, & G. S. (2016). Teor de proteína e óleo em grãos de soja, em diferentes épocas de plantio para fins industriais. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*. 10(3), 49-53.

- Marcos Filho, J. (2005). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. (5a ed). Piracicaba: FEALQ, 495p.
- Nascimento, R., & Mosquim, P. R. (2004). Crescimento e teor de proteínas em sementes de soja sob influência de hormônios vegetais. *Revista Brasileira de Botânica*, 27(3), 573-579.
- Pinheiro, L. C. M., God, P. I. V. G., Faria, V. R., Oliveira, A. G., Hasui, A. A., Pinto, E. H. G., Arruda, K. M. A., Piovesan, N. D., & Moreira, M. A. (2013). Parentesco na seleção para produtividade e teores de óleo e proteína em soja via modelos mistos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(9), 1246-1253. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900008>
- Portugal, J. R., Arf, O., Peres, A. R., Gitti, D. C., Rodrigues, R. A. F. Garcia, N. F. S., & Garé, L. M. Azospirillum brasilense promotes increment in corn production. *African Journal of Agricultural Research*. 11(19), 1688-1698. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10723>
- Sales, P. V. G., Peluzio, J. M., Aferri, F.S., Sales, A. C. R., & Sales, V. H. G. (2016). Effect of pods' position on the protein content in soybean grains at low latitude. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 3(4), 216-221. <https://doi.org/10.18067/jbfs.v3i4.102>
- Saubidet, M. I., Fatta, N., Barneix, A. J. (2002). The effect of inoculation with Azospirillum brasilense on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, 245(1), 215-222. <https://doi.org/10.1023/A:1020469603941>
- Taiz, L. & Zeiger, L. 2002. Plant Physiology. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland. PMCID:PMC152206
- Huizen, R. van, Ozga, J. A., & Reinecke, D. M. (1996). Influence of auxin and gibberellin on in vivo protein synthesis during early pea fruit growth. *Plant Physiology*, 112(1), p.53-59, Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC157922/pdf/1120053.pdf>
- Zuffo, A. M., Rezende, P. M., Bruzi, A. T., Oliveira, N. T., Soares, I. O., Neto, G. F. G., Cardillo, B. E. S., & Silva, L. O. (2015). Co-inoculation of Bradyrhizobium japonicum and Azospirillum brasilense in the soybean crop. *Revista Ciências Agrárias*, 38(1), 87-93.