



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BETTINA BERQUÓ MARKS

**AÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E DE
INOCULANTES MICROBIANOS NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) E MILHO
(*Zea mays* L.)**

BETTINA BERQUÓ MARKS

**AÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E DE
INOCULANTES MICROBIANOS NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) E MILHO
(*Zea mays* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariangela Hungria.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M346a Marks, Bettina Berquó.
Ação de metabólitos secundários e de inoculantes microbianos na promoção do crescimento de soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) e milho (*Zea mays* L.) / Bettina Berquó Marks. – Londrina, 2013.
121 f. : il.

Orientador: Mariângela Hungria.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Microorganismos do solo – Teses. 2. Azospirillum – Teses. 3. Nitrogênio – Fixação – Teses. 4. Crescimento (Plantas) – Teses. 5. Soja – Teses. 6. Milho – Teses. Hungria, Mariângela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 631.461

BETTINA BERQUÓ MARKS

**AÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E DE INOCULANTES
MICROBIANOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merr.) E MILHO (*Zea mays* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Mariangela Hungria
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Martins Mercante
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Dr. Ricardo Araujo
Total Biotecnologia

Londrina, 22 de fevereiro de 2013

À minha mãe,

À minha irmã,

Ao meu amor, Rafael

com amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Gostaria aqui, de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram para que esse trabalho fosse realizado.

Primeiramente, agradeço minha orientadora e segunda mãe, Mariangela Hungria, pelo apoio, hospitalidade e amizade incondicionais desde o momento em que cheguei a Londrina, me acolhendo em sua própria casa e apostando em mim e na minha vontade de realizar este trabalho. Obrigada pela orientação e conselhos tanto científicos quanto pessoais que me destes ao longo desses dois anos, e pelo exemplo maravilhoso de mulher, mãe e profissional digno de toda a minha admiração.

Ao meu amor, Rafael, por ter acreditado em mim e em nosso relacionamento, largando tudo em Porto Alegre para vir para Londrina ficar comigo. Obrigada por todo apoio, amor, carinho e companheirismo comigo durante todo esse tempo. Por ter me feito uma pessoa melhor, jamais esquecerei.

À minha família, em especial à minha mãe, Laura, que sempre me incentivou e me apoiou de todas as formas para que eu seguisse no caminho acadêmico. Obrigada por tudo, pelas conversas, esclarecimentos, conselhos, apoio financeiro e por ser a melhor mãe do mundo e meu exemplo máximo de pessoa justa, honesta e amorosa. Te amo e admiro.

Ao Vander, por toda a gentileza e carinho para comigo e minha irmã. E por fazer minha mãe feliz.

À minha irmã, Daniela, por ser antes de tudo, minha melhor amiga e companheira da vida toda. Por sempre me escutar, me ajudar de todas as formas possíveis, e pelas visitas que me fez aqui em Londrina, proporcionando ótimos momentos.

Aos meus amigos de Porto Alegre, em especial às minhas amigas-irmãs Taíse e Ludmila, por estarem sempre presentes, mesmo que distantes fisicamente, nos momentos de vitória e de alegria, e nos de angústia e confusão. E por me fazerem ter certeza de que amizades verdadeiras não acabam com o tempo e nem com a distância.

À minha eterna “chefa” e amiga querida, Eliane Bangel, por todos os ensinamentos científicos e de vida, e por todas as oportunidades que me

proporcionou, inclusive a de vir para Londrina fazer o mestrado. Por ter acreditado em mim e na minha capacidade, e por ensinar praticamente tudo o que sei sobre rizobiologia.

Aos membros da banca, Dr. Fábio Mercante e Dr. Ricardo Araujo, por terem me dado a honra de aceitar o convite de participar desse momento importante da minha vida, e por usarem seu vasto conhecimento na área para engrandecer o meu trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa, quero agradecer imensamente por terem me recebido de braços abertos, por toda a amizade e momentos maravilhosos que me proporcionaram nestes dois anos de convivência: Adalgisa, Lígia, Eduara, Renata, Jesiane, Gesiele, Douglas, Maria, Leopoldo, Rebeca, Vivian, Hosana, Josi, Cris, Arthur, Jake, Rafaela, Marcos, Pâmela, Renan, Giba, Diogo, Amaral, Débora e dona Rosa. Ao Rinaldo, por toda a amizade, e pela grande ajuda na montagem e manutenção dos ensaios de casa de vegetação. Ao Marquito, por ter feito praticamente todo o trabalho braçal de correção do solo, e pelos grandes ensinamentos agrônômicos e de vida. À Letícia, Adriana, Anna, Talita, Paula, Biana e Dáfila, por terem se tornado, com certeza, amigas de toda uma vida.

Aos pesquisadores Marco Antônio Nogueira e Manuel Megías, por terem, efetivamente, contribuído para a realização deste trabalho, com sugestões, diretrizes e apoio. Muito obrigada!

Aos funcionários, colegas e professores do curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelo conhecimento transmitido e o apoio concedido.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja pela estrutura que me foi concedida para a realização deste trabalho e aos funcionários que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos meus cães, Murruga, Pretinha e Amy, pelo amor incondicional que me despertam, pela lealdade, companheirismo e lambidas de carinho em todos os momentos.

MARKS, Bettina Berquó. **Ação de metabólitos secundários e de inoculantes microbianos na promoção do crescimento de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e milho (*Zea mays* L.).** 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

RESUMO

Com a atual deterioração ambiental, causada, entre outros fatores, pelo aumento progressivo da população mundial, o Brasil, em um futuro próximo, se destacará como sendo um celeiro de alimentos mundial. Entre as culturas que desempenham papel importante no cenário agrícola brasileiro destacam-se a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o milho (*Zea mays* L.). A substituição do uso de fertilizantes nitrogenados por bio-fertilizantes e inoculantes contendo bactérias rizosféricas fixadoras de nitrogênio (rizóbios) e promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) pode diminuir os custos de produção para os agricultores e diminuir a poluição ambiental, através da redução da emissão de gases poluentes, e contaminações de solos e lençóis freáticos. Os microrganismos rizosféricos conhecidamente produzem compostos derivados de seu metabolismo secundário, que aumentam sua sobrevivência e podem ainda promover o crescimento vegetal. Entre esses compostos destacam-se os antimicrobianos, exopolissacarídeos, lipoquitooligossacarídeos (LCOs) e hormônios vegetais. Apesar dos recentes avanços no entendimento de como as sinalizações químicas bactéria-planta hospedeira se dão, moléculas provenientes do metabolismo secundário bacteriano ainda são parcamente utilizadas para aumentar a produção agrícola. Neste estudo foram testados os efeitos de metabólitos secundários concentrados (MSCs) de duas estirpes de rizóbios, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 e *Rhizobium tropici* CIAT 899, em diferentes concentrações, em duas importantes interações bactéria-planta: *B. japonicum*-soja e *Azospirillum brasilense*-milho. Para soja, foram feitos dois ensaios a campo e dois ensaios em casa de vegetação, onde o efeito da adição de MSC homólogo e heterólogo, e do flavonoide indutor genisteína, adicionados a inoculante contendo *B. japonicum*, foram testados. Para milho foram realizados três ensaios a campo e três ensaios em casa de vegetação, para observar os efeitos no crescimento da cultura, da adição de MSCs provenientes de ambas estirpes, a inoculante contendo *A. brasilense*. Foram analisados os seguintes parâmetros: massa da parte aérea seca (MPAS), teor de N na parte aérea (mgN/g), acúmulo de N na parte aérea (mgN/pl) [em soja e milho em todos os ensaios]; massa da raiz seca (MRS) [em soja e milho em casa de vegetação]; produção de grãos (PROD) [em soja e milho a campo]; número de nódulos (NN) e massa de nódulos seca (MNS) [em soja em todos os ensaios]. Nos ensaios a campo de soja, quando comparado ao tratamento somente inoculado, o tratamento com a adição de MSC de *B. japonicum* USDA 110 a 10⁻⁹ M obteve os maiores valores absolutos de número e massa seca de nódulos, e uma produção de grãos 4% maior. Já nos ensaios em casa de vegetação, a adição de MSCs não produziu plantas de soja com valores significativamente maiores do que os demais tratamentos. Em milho, nos ensaios a campo, os maiores valores absolutos foram obtidos no tratamento com a adição de MSC proveniente de *R. tropici* CIAT 899 a 10⁻⁸ M, com aumentos de produção que chegaram a 17% quando comparados ao tratamento inoculado + 75%N. Nos ensaios de casa de vegetação, as plantas de milho que obtiveram os maiores valores absolutos nos parâmetros analisados foram

aquelas tratadas com MSCs provenientes de *B. japonicum* USDA 110 na concentração 10^{-9} M. Os benefícios observados neste trabalho podem ser devidos à combinação de efeitos positivos provenientes dos MSCs adicionados aos inoculantes, incluindo os efeitos protetores dos exopolissacarídeos, e os efeitos promotores de crescimento dos LCOs e dos hormônios vegetais. Tais resultados chamam atenção para o potencial biotecnológico do uso de metabólitos microbianos secundários de rizóbios, que adicionados a inoculantes contendo rizóbios ou BPCP, podem promover o crescimento e aumentar a produção agrícola.

Palavras-chave: *Azospirillum*. *Bradyrhizobium*. *Glycine max*. LCO. *Rhizobium*. *Zea mays*. Metabólitos microbianos secundários.

MARKS, Bettina Berquó. **Action of secondary metabolites and microbial inoculants in growth promoting of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and maize (*Zea mays* L.).** 2013. 121 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

ABSTRACT

With the current environmental deterioration, caused, among other factors, by the progressive increase of the world population, Brazil stand out as being a storehouse of food worldwide. Among the cultures that play an important role in the Brazilian agricultural scenario we highlight the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and maize (*Zea mays* L.). The substitution of nitrogen fertilizer use by bio-fertilizers and inoculants containing nitrogen-fixing rhizospheric bacteria (rhizobia) and plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) can lower production costs for farmers and reduce environmental pollution by reducing the greenhouse-gas emissions, and contamination of soil and groundwater. The rhizosphere microorganisms known to produce compounds derived from secondary metabolism, which increases their survival and can also promote plant growth. Among these compounds stand out antimicrobials, exopolysaccharides, lipochitooligosaccharides (LCOs) and plant hormones. Despite recent advances in understanding how the chemical signals bacteria-host plant occur, molecules derived from bacterial secondary metabolism are still poorly used to increase agricultural production. This study tested the effects of concentrated secondary metabolites (CSMs) from two strains of rhizobia, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Rhizobium tropici* CIAT 899 at different concentrations, in two important plant-bacteria interactions: *B. japonicum*-soybean and *Azospirillum brasilense*-maize. For the soybean, two field and two greenhouse experiments were performed and effects of addition of homologous and heterologous CSM, and of the flavonoid genistein, added the inoculant containing *B. japonicum* were investigated. For the maize, three field and three greenhouse experiments were performed to verify the effects of the CSM addition, from both strains, to inoculant containing *A. brasilense*. The following parameters were analysed: dry mass of shoots (DMS), N content in shoot (mgN/g), N accumulation in the shoot (mgN/pl) [in soybean and maize field and greenhouse experiments]; dry mass of root (DMR) [in soybean and maize greenhouse experiments]; grain production (PROD) [in soybean and maize field experiments]; nodule number (NN) and dry mass of nodules (DMN) [in soybean experiments]. For the soybean, compared with the treatment inoculated exclusively with *B. japonicum*, benefits were achieved with the addition of *B. japonicum* CSM, and at the concentration of 10^{-9} M improved dry weight of nodules and grain yield by an average of 4%. In greenhouse experiments, the addition of CSMs did not produce soybean plants with significantly higher values than the other treatments. For the maize field experiments, the best results were obtained with the addition of *R. tropici* CSM at the concentration of 10^{-8} M, increasing grain yield by an average of 17% when compared to treatment inoculated + 75% N. In greenhouse experiments, maize plants that have the best parameters were those treated with CSM derived from *B. japonicum* at a concentration 10^{-9} M. Benefits might be related to a combination of positive effects attributed to CSMs, including the protective effects of exopolysaccharides, and the growth promoting effects of LCO and plant hormones. The results emphasize the biotechnological potential of using secondary

microbial metabolites of rhizobia together with inoculants containing both rhizobia and PGPR to improve plant growth and yield of grain crops.

Keywords: Azospirillum. Bradyrhizobium. Glycine max. LCO. Rhizobium. Zea mays. Microbial secondary metabolites.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise química, granulométrica e da população microbiana nativa (0-20 cm) dos solos das áreas experimentais, antes da instalação dos experimentos.	52
Tabela 2 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios a campo.	52
Tabela 3 - Locais e datas de semeadura das culturas da soja e do milho nos ensaios realizados a campo.	53
Tabela 4 - Tratamentos realizados em sementes de soja e milho para plantio a campo, na safra 2011/2012.	53
Tabela 5 - Locais e datas de colheita da cultura da soja e de milho nos ensaios realizados a campo.	54
Tabela 6 - Características químicas e granulométricas do solo empregado nos ensaios de casa de vegetação 1.	55
Tabela 7 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios em casa de vegetação 1.	57
Tabela 8 - Tratamentos realizados em sementes de soja (Vasos de Leonard) e milho (Vasos de Leonard e vasos com solo) para plantio em casa de vegetação.	58
Tabela 9 - Características químicas do solo empregado nos ensaios de casa de vegetação 2.	59
Tabela 10 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios em casa de vegetação 2.	60
Tabela 11 - Tratamentos realizados em sementes de soja e milho em ensaios de casa de vegetação (vasos com solo).	60
Tabela 12 - Efeito da inoculação com <i>Azospirillum</i> e diferentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS), produção de grãos (kg/ha, PROD), e N na	

	parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em campo, no período de dezembro/fevereiro de 2012.....	65
Tabela 13 -	Efeito da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e diferentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS), produtividade de grãos (kg/ha, PROD), e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em campo, no período de dezembro a fevereiro de 2012.	66
Tabela 14 -	Efeito da inoculação com <i>Azospirillum</i> e difentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS, massa da raiz seca, MRS e diâmetro do caule no 2° nó, DC), e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em Vasos de Leonard e vasos com solo em casa de vegetação, no período de janeiro/fevereiro de 2012.....	68
Tabela 15 -	Efeito da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e difentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS, e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em Vasos de Leonard, no período de janeiro/fevereiro de 2012.....	69
Tabela 16 -	Efeito da inoculação com <i>Azospirillum</i> e difentes quantidades de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS) e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em vasos com solo em casa de vegetação, no período de junho/agosto de 2012.	70

Tabela 17 - Efeito da inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e difentes quantidades de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS) e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em vasos com solo em casa de vegetação, no período de junho/agosto de 2012.....	71
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	O PAPEL DO BRASIL NO CENÁRIO AGRÍCOLA MUNDIAL.....	18
2.2	O CULTIVO DE SOJA NO BRASIL	19
2.3.	O CULTIVO DE MILHO NO BRASIL.....	20
2.4.	A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	22
2.5.	MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS.....	27
2.5.1	Diazotróficos Simbióticos: Microsimbiontes da Soja.....	27
2.5.1.1	A espécie b. Japonicum.....	28
2.5.2	Azospirillum spp. e a Promoção do Crescimento de Plantas	30
2.6	Inoculantes	33
2.6.1	Inoculantes Contendo Rizóbios para Soja.....	33
2.6.2	Uso de Azospirillum Brasilense em Inoculantes no Brasil	35
2.7	METABÓLITOS MICROBIANOS SECUNDÁRIOS	36
2.7.1	Antimicrobianos	39
2.7.2	Exopolissacarídeos Protetores	40
2.7.3	Fatores nod (Icos).....	41
2.7.4	Hormônios Vegetais	44
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Ensaio a Campo	51
4.1.2	Delineamento Experimental.....	51
4.1.3	Análise e Preparo dos Substratos Utilizados.....	51
4.1.4	Tratamento das Sementes e Semeadura	52
4.1.5	Procedimentos de Amostragem	54
4.2	ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	55
4.2.1	Delineamento Experimental.....	55

4.2.2	Ensaio em Casa de Vegetação 1.....	55
4.2.2.1	Análise e preparo dos substratos utilizados	55
4.2.2.2	Tratamento das sementes e semeadura	57
4.2.3	Ensaio em Casa de Vegetação 2.....	58
4.2.3.1	Análise e preparo dos substratos utilizados	58
4.2.3.2	Tratamento das sementes e semeadura	59
4.2.4	Condução dos Experimentos.....	61
4.2.5	Procedimentos de Amostragem	61
4.3	TEOR DE NITROGÊNIO DA PARTE AÉREA	61
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
5	RESULTADOS	63
5.1	ENSAIOS A CAMPO	63
5.1.1	Milho	63
5.1.2	Soja	64
5.2	ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 1	67
5.2.1	Milho	67
5.2.2	Soja	67
5.3	ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 2.....	69
5.3.1	Milho	69
5.3.2	Soja	70
6	DISCUSSÃO	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXOS	98
	ARTIGO	99

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos causada pelo aumento progressivo da população mundial, associada à deterioração ambiental progressiva, tornou-se um grande problema para a agricultura mundial (Barassi et al., 2008). Ao que tudo indica, o Brasil, nos próximos anos, se consolidará como grande protagonista na produção e na comercialização mundial de alimentos, fibras e biomassa. Desse modo, os desafios para a criação de tecnologias sustentáveis e de baixo custo ficarão complexos e amplos, pois deverão satisfazer as necessidades e expectativas da população mundial.

Dentre as culturas que desempenham um importante papel no cenário agrícola brasileiro, destacam-se a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), como leguminosa, e o milho (*Zea mays* L.), como gramínea. No caso da soja, o Brasil ocupa o segundo lugar em produção mundial. Tal patamar foi atingido graças ao fato dessa oleaginosa ser cultivada, principalmente, em grandes propriedades e aos investimentos significativos em pesquisa e tecnologia, permitindo grandes produtividades.

Entre os elementos que são importantes para o bom desenvolvimento das culturas, figura o nitrogênio (N). O nitrogênio é essencial ao desenvolvimento vegetal, fazendo parte de diversas moléculas e rotas metabólicas. Os solos brasileiros são naturalmente deficientes nesse nutriente, e suprem apenas parcialmente a demanda deste elemento às culturas. Tal demanda pode ser total ou parcialmente suprida pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Hungria et al., 2005a). A FBN pode ser realizada por microrganismos associativos, como os pertencentes ao gênero *Azospirillum*, que colonizam principalmente a rizosfera e raízes de gramíneas, forrageiras e cereais; por microrganismos endofíticos, que colonizam tecidos vegetais caulinares e radiculares, como a bactéria *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, que coloniza plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.); ou por microrganismos simbióticos, onde destaca-se o grupo de bactérias chamadas de rizóbios, que infectam e colonizam raízes de plantas (principalmente leguminosas), formando órgãos especializados, onde ocorre a FBN, chamados nódulos.

O uso de fertilizantes nitrogenados e a FBN representam os principais meios de retornar o nitrogênio perdido aos solos agrícolas. Contudo, a

eficiência da fertilização nitrogenada raramente alcança 60%, representando até 40% do custo total da produção. Tais insumos possuem, também, alto custo ambiental, sendo considerados como as maiores fontes de poluição ambiental dos sistemas agrícolas (Machado & Magnavaca, 1991).

Em contrapartida, a fixação biológica do nitrogênio representa um importante fator de competitividade do setor agrícola brasileiro. Produtos inoculantes contendo bactérias diazotróficas tem sido amplamente utilizados, principalmente na cultura de soja (com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*), onde podem substituir totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados, e com um custo bastante baixo (Crispino et al., 2001). Grande variedade de genótipos vegetais de importância agrícola foi melhorada para que fosse possível a diminuição do uso de insumos químicos. O mercado de inoculantes agrícolas para plantas leguminosas movimentam milhões de dólares anualmente (Silva, 2006).

A FBN tem recebido ainda mais destaque dentro do cenário agrícola brasileiro, por fazer parte de uma das metas do Programa ABC – Agricultura de Baixo Carbono - do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entre as metas propostas pelo programa está a “Expansão da adoção da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) em 5,5 milhões de hectares de áreas de cultivo, em substituição ao uso de fertilizantes nitrogenados” (MAPA, 2012).

Tem-se constatado uma busca crescente para aprimorar os produtos inoculantes, visando ao aumento da FBN, da absorção de outros nutrientes com maior eficiência, e da promoção do crescimento das raízes, resultando no aumento da produção agrícola. Entre essas novas tecnologias em estudo, destaca-se a adição de metabólitos secundários microbianos específicos a inoculantes. Tais metabólitos tem como característica principal não serem essenciais ao crescimento e reprodução do organismo produtor. Possuem diversas funções biológicas, como a estimulação do crescimento vegetal, produção de lipopolissacarídeos e antibióticos, assim como moléculas precursoras dos processos simbióticos.

Diante da extrema importância agrônômica, econômica e ambiental da difusão e ampliação do uso de inoculantes agrícolas no Brasil, este trabalho teve como objetivo o estudo dos processos de nodulação, fixação de nitrogênio e promoção do crescimento de plantas, frente à adição de metabólitos microbianos secundários potencializadores da simbiose e do crescimento de plantas a inoculantes contendo *Bradyrhizobium japonicum* para a cultura da soja e

Azospirillum brasilense para a cultura do milho. Com isso, visou-se ao aprimoramento da ação dos inoculantes microbianos e a obtenção de produtos mais eficazes no que diz respeito à nodulação, à fixação de nitrogênio e à promoção do crescimento das plantas, resultando em incremento da produtividade em culturas leguminosas e de gramíneas, associado ao baixo custo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PAPEL DO BRASIL NO CENÁRIO AGRÍCOLA MUNDIAL

A crescente demanda por alimentos causada pelo aumento progressivo da população mundial, associada à deterioração ambiental, tornou-se um grande problema para a agricultura mundial (Barassi et al., 2008). A queda da produção agrícola causada por problemas ambientais, tais como a salinização de corpos d'água e dos solos e a escassez de água, agrava-se com as mudanças climáticas globais. Em contrapartida, o desenvolvimento da agrobiotecnologia tem diminuído os efeitos negativos dos estresses abióticos sobre a produção vegetal.

Nesse contexto, o Brasil é considerado, atualmente, um celeiro mundial de alimentos e conta com uma matriz energética relativamente limpa e renovável, se comparado a outros países (Cruz, 2011). Estima-se que a área brasileira disponível para expansão agrícola (terras não cultivadas e não ocupadas por florestas) seja de 45 milhões de hectares, sendo o país com maior área agricultável ainda não utilizada do mundo, que poderia estar disponível para diversos cultivos (Nassar & Ortiz, 2010). Em função do baixo nível tecnológico aplicado na agricultura, porém, o Brasil possui, em termos gerais, uma baixa produtividade agrícola, apesar do imenso potencial e dos grandes montantes de terra disponíveis (Cruz, 2011). Esse cenário demanda maiores investimentos em tecnologias que foquem na tendência da sustentabilidade, suprindo as necessidades da geração presente, sem afetar o suprimento de gerações futuras (Nassar & Ortiz, 2010).

Ao que tudo indica, o Brasil, nos próximos anos, se consolidará como grande protagonista na produção e comercialização mundial de alimentos, fibras e biomassa. Desse modo, os desafios para a criação de tecnologias sustentáveis e de baixo custo ficarão complexos e amplos, já que terão de satisfazer as necessidades e expectativas da população mundial, expectativas essas, que consistem em traçar um modelo que harmonize a produção econômica, o equilíbrio ambiental e a responsabilidade social (Cruz, 2011). Dentre as culturas que desempenham um importante papel no cenário agrícola brasileiro, destacam-se a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o milho (*Zea mays* L.). No caso da soja, o Brasil ocupa o segundo lugar em produção mundial. Tal patamar foi atingido graças ao fato

desta oleaginosa ser cultivada principalmente em grandes propriedades e aos significativos investimentos em pesquisa e tecnologia agrícola, que permitem o alcance de grandes produtividades.

2.2 O CULTIVO DE SOJA NO BRASIL

A soja, como é conhecida atualmente, originou-se de plantas rasteiras nativas do leste da Ásia, principalmente às margens do Rio Amarelo, na China. Através de cruzamentos de espécies selvagens, há pelo menos 5000 anos, o grão tornou-se base da alimentação dos povos orientais, sendo considerada uma das mais antigas plantas cultivadas do planeta (Embrapa Soja, 2004).

A soja chegou ao Brasil em 1882, trazida dos Estados Unidos pelo agrônomo Gustavo D'utra. Até meados dos anos 1950, porém, a soja era cultivada como forrageira, eventualmente também produzindo grãos para consumo animal. Somente nos anos de 1960, impulsionada pela política de subsídios financeiros ao plantio de trigo (com o qual se fazia rotação de culturas com a soja), esta leguminosa tornou-se economicamente importante para o Brasil, sendo a Região Sul a principal produtora nessa época (Embrapa Soja, 2004).

Com o aumento explosivo da cotação internacional do grão em 1973 – devido ao aumento da demanda por alimentos proteicos nos países desenvolvidos e à queda da oferta de outras matérias-primas ricas em proteínas – houve uma rápida expansão do cultivo desta leguminosa no Brasil, influenciada, ainda, pelo incentivo governamental e por fatores edafoclimáticos favoráveis (Mueller, 1992).

Desse modo, foi na década de 1970 que se deu o incremento significativo da produção de soja no Brasil, passando da produção anual de 1,5 milhão de toneladas em 1970, para mais de 15 milhões de toneladas em 1979. Esse crescimento foi possível devido ao aumento da área cultivada e, também, ao expressivo crescimento da produtividade devido às novas tecnologias tornadas disponíveis ao produtor (CONAB, 2011).

Nessa época, o cultivo de soja começou a espalhar-se para a região central do Brasil, até então praticamente despovoada e com baixos níveis de desenvolvimento. Isso propiciou uma profunda mudança na região, com a fundação de cidades e intenso desenvolvimento sócio-econômico e tecnológico. O plantio da soja foi também o responsável pela aceleração da mecanização das lavouras

brasileiras, modernização do sistema de transporte, expansão das fronteiras agrícolas, interiorização da população e grande incentivo à agroindústria nacional (Embrapa Soja, 2004).

Segundo dados da CONAB, a produção de soja no Brasil na safra 2012/2013 poderá chegar à expressiva marca de 82 milhões de toneladas, com destaque para o estado de Mato Grosso, maior produtor nacional (24 milhões de toneladas) (CONAB, 2012). Estes números podem tornar o Brasil o maior produtor e exportador mundial de soja, visto que os Estados Unidos, atual maior produtor, vem sofrendo sucessivas quebras de safra (CONAB, 2012). O cultivo desta leguminosa responde, hoje, por uma receita cambial direta de mais de US\$ 29 bilhões anuais para o país (ABIOVE, 2012), e cinco vezes esse valor se forem considerados os benefícios gerados ao longo de toda a cadeia produtiva.

Em função do grande valor agregado que esta oleaginosa possui, muito se tem investido em pesquisas, visando ao aumento da produtividade e à diminuição dos impactos ambientais gerados pelo seu cultivo. Tais estudos já permitiram o desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas às condições edafoclimáticas de cada região do país; um melhor manejo de plantas invasoras e pragas, possibilitando uma redução sensível no uso de pesticidas; uma melhoria das técnicas de adubação, com o desenvolvimento de inoculantes contendo bactérias fixadoras do nitrogênio substituindo, parcial ou totalmente, a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados; e um melhor manejo do solo, com a implantação do plantio direto e da sucessão de culturas, com reflexos positivos na sustentabilidade dos sistemas produtivos. Além disso, estudos sobre as características nutricionais da soja tem promovido sua incorporação à dieta dos brasileiros, tornando a produção menos dependente das flutuações do mercado externo (Embrapa Soja, 2004).

2.3 O CULTIVO DE MILHO NO BRASIL

Dentre as inúmeras espécies cultivadas no Brasil anualmente, as gramíneas, especialmente o milho e o trigo (*Triticum aestivum* L.), possuem um papel essencial, tanto para a alimentação humana, quanto para a alimentação animal.

O milho é um cereal cultivado em grande parte do mundo. Os primeiros registros de seu cultivo datam de 7000 anos no Golfo do México e ilhas

adjacentes, com posterior dispersão para a América do Sul, há pelo menos 4000 anos (CIB, 2011). Foi o cereal base da alimentação de povos meso-americanos, como os incas, os maias e os astecas, e de povos andinos. Com o início da era das grandes navegações no século XVI e o início do processo de colonização das Américas, a cultura do milho se expandiu para outras regiões. Hoje, é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para o cultivo mundial de trigo e arroz (*Oryza sativa* L.) (CIB, 2011).

O milho é cultivado no Brasil com diversas finalidades: agricultura de subsistência, que remonta da época do pré-descobrimento do Brasil pelos portugueses; exportação para países com menor área agricultável, atividade crescente nos últimos anos; abastecimento do mercado interno; e, principalmente, fabricação de ração animal, à qual se destina a maior parte da produção nacional – cerca de 80% (Santos & Pires, 2004). Por sua versatilidade de uso, pelos desdobramentos de produção animal e pelo aspecto social, o milho é um dos mais importantes produtos do setor agrícola brasileiro, sendo a cultura que ocupa a maior área cultivada no país, predominando nas regiões Centro-Sul e Sul. Em função da grande diversidade edáfica e climática entre as regiões nas quais esta gramínea é cultivada, e da baixa tecnologia empregada no plantio, principalmente em pequenas e médias propriedades, o rendimento médio de grãos tem sido baixo nos últimos anos. A estimativa de produção para o Sul do Brasil é de 65 milhões de toneladas, com rendimento médio de 5,5 t ha⁻¹ (CONAB, 2012). Estes valores, porém, variam muito entre as propriedades, dependendo dos padrões tecnológicos aplicados, do tamanho da área cultivada, da escala de produção e da disponibilidade de recursos para a aplicação de insumos nas lavouras (Santos & Pires, 2004).

Contudo, o avanço na profissionalização da produção de milho tem acompanhado o crescimento de toda a cadeia produtiva, tanto para a produção de proteína animal, quanto para a conjugação com a soja, em áreas aptas à produção de grãos, seja em rotação de culturas, ou em sucessão, na safra de inverno (safrinha) (Duarte et al., 2007). A rotação de culturas envolvendo o plantio do milho é fundamental para a sustentabilidade do sistema plantio direto, principalmente com a cultura de soja (Santos & Pires, 2004), propiciando a ciclagem de nutrientes e o equilíbrio biológico no controle de doenças e insetos. Em se tratando da cultura da soja, o rendimento dos grãos tem-se mostrado maior quando em rotação com a cultura de milho, quando comparado à monocultura.

O milho também tem sido bastante utilizado em consórcio com a forrageira *Brachiaria bizantha*, em sistemas lavoura-pecuária, sendo uma alternativa para regiões onde o cultivo de safrinha tem apresentado insucesso, devido à baixa disponibilidade hídrica e irregularidades no regime pluviométrico. Nesse tipo de plantio, a forrageira tem a função de fornecer alimento para a exploração pecuária e, posteriormente, de formação de palhada, para o cultivo da cultura produtora de grãos, em sistema plantio direto (Borghi & Crusciol, 2007).

A palha do milho também tem sido amplamente utilizada para a recuperação de solos degradados, já que fornece grande aporte de matéria orgânica, necessária ao restabelecimento da microbiota nativa e da capacidade de infiltração e armazenamento de água. O milho apresenta a vantagem de produzir grande quantidade de fitomassa e elevada relação C/N, que contribui para a melhor cobertura do solo, tanto em quantidade, como em tempo de permanência na superfície (Santos & Pires, 2004). Além disso, o milho possui grande importância sócio-econômica em todos os estados brasileiros, principalmente onde se concentram criadores de animais de pequeno porte, gerando emprego e renda. Esta cultura está envolvida em diversas cadeias produtivas, desde a produção e distribuição de insumos, maquinário, equipamentos e serviços, até indústrias relacionadas ao setor animal, silos e secadores (Santos & Pires, 2004).

Estudos apontam que a média de produtividade do milho no Brasil deve duplicar nos próximos anos como consequência da maior adoção do plantio direto, da correção e fertilização adequada do solo, da utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas e/ou fixadoras de nitrogênio, como o *Azospirillum* ssp., do manejo integrado de plantas invasoras, doenças e pragas e da utilização de sementes geneticamente modificadas (Cruz, 2011).

2.4 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Na agricultura como um todo, a complementação nutricional para as culturas se faz importante no contexto produtivo (Harper, 1994). Entre os elementos considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas, destaca-se o nitrogênio, quarto elemento mais abundante nas plantas (8-16% da composição vegetal). Além de influenciar o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, também participa de uma série de rotas metabólicas-chave e da constituição

essencial de moléculas como a clorofila, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas, vitaminas, hormônios, aminoácidos e proteínas (Martini Júnior, 2010; Ribeiro, 2011).

Apesar de ser um elemento extremamente abundante na atmosfera terrestre (aproximadamente 79% da composição total), o nitrogênio, em sua forma elementar (N_2), não é assimilável pelas plantas, incapazes de quebrar a forte ligação tríplice que une os dois átomos da molécula, tornando-a pouco reativa. Já em suas formas assimiláveis (nitratos e amônia, por exemplo), o nitrogênio é o nutriente mais difícil de ser manejado nos solos de regiões tropicais e subtropicais, em virtude do grande número de reações a que está sujeito e à sua alta instabilidade no solo (Ernani, 2003). Essas características tornam a disponibilidade de nitrogênio, na maior parte dos casos, um fator limitante à produção agrícola (Silva, 2006). Os solos brasileiros são naturalmente deficientes em N, e suprem apenas parcialmente a demanda deste elemento às culturas. Os processos de desnitrificação, volatilização da amônia e queimadas retornam o nitrogênio retido no solo à forma gasosa, e a lixiviação de nitratos para as camadas mais profundas do solo conduz à perda de N nos ecossistemas tropicais (Silva, 2006).

O nitrogênio elementar existente em abundância na atmosfera somente pode ser assimilado por um grupo seletivo de microrganismos procarióticos, principalmente bactérias, denominados diazotróficos. Esses microrganismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em formas assimiláveis pelos vegetais. Esse processo é denominado fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Silva, 2006).

A FBN é realizada em condições limitadas de N por bactérias pertencentes a diversos gêneros. Tais organismos diazotróficos podem ser classificados conforme o tipo de interação que estabelecem com a planta (Beattie, 2007): associativos (fixam nitrogênio colonizando preferencialmente a rizosfera), endofíticos (fixam nitrogênio quando colonizam o tecido radicular ou caulinar), e simbióticos (fixam nitrogênio quando colonizam células radiculares, formando estruturas especializadas, os nódulos).

O gênero *Azospirillum* é bastante conhecido por ser um diazotrófico associativo, que coloniza a rizosfera de gramíneas, forrageiras e cereais (Döbereiner & Baldani, 1982), como milho, arroz, cana-de-açúcar e sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), entre outras (Döbereiner et al., 1976). Quando ocorre a invasão das

raízes, há a colonização de espaços intercelulares da epiderme e do córtex radicular na zona de alongamento e de formação de pelos radiculares (Patriquin & Döbereiner, 1978). Além da fixação de nitrogênio atmosférico, o gênero *Azospirillum* também é conhecido por produzir hormônios estimulantes do crescimento vegetal (auxinas, giberelinas e citoquininas) (Hartmann & Zimmer, 1994) e, com isso, promover um aumento da densidade dos pelos radiculares, além do aparecimento de raízes secundárias (Silva, 2006). Este incremento nas raízes aumenta consideravelmente a superfície de absorção de água e nutrientes pela planta, elevando sua capacidade produtiva e de resistência a estresses ambientais (Baldani et al., 1983). Em associação com gramíneas *Azospirillum*, em geral, pode promover incrementos entre 5 e 30% na produção (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

Já entre os microrganismos simbióticos, destaca-se o grupo formado por diversos gêneros, denominados coletivamente de rizóbios, que fixa o nitrogênio atmosférico através de uma íntima associação simbiótica com as raízes de vegetais pertencentes, principalmente, à família Leguminosae (Fabaceae), formando estruturas altamente especializadas, denominadas nódulos. Dentro dos nódulos ocorre a FBN propriamente dita (Oliveira, 2009). A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, como na bactéria. Enquanto as mudanças na bactéria visam, principalmente, ao recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor, necessários para o processo de fixação biológica, as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria et al., 1994).

Todo o processo de associação simbiótica bactéria-planta é iniciado com uma intensa troca de sinais moleculares entre os organismos envolvidos. A planta hospedeira secreta substâncias quimiotáticas (açúcares, aminoácidos e ácidos carboxílicos), que estimulam a multiplicação de bactérias na rizosfera e promovem a adesão dos rizóbios aos pelos radiculares das plantas (Hungria, 1994). Além desses compostos, concomitantemente, a planta libera também uma série de compostos fenólicos e betaínas, que induzem à transcrição e à expressão de determinados genes na bactéria, denominados genes de nodulação (Brencic & Winans, 2005; Pinto et al., 2007). Esses genes ativados promovem a síntese de pequenas moléculas pela bactéria. Tais moléculas, provenientes do metabolismo secundário, são liberadas externamente em quantidades ínfimas e percebidas pela

planta hospedeira, ativando o início do processo da simbiose propriamente dito (Oliveira, 2009). Além de serem responsáveis pelas modificações radiculares que permitem a infecção da planta pela bactéria simbiote, essas moléculas induzem à síntese de proteínas e promovem a formação do primórdio nodular. No nódulo, após sua total maturação, as bactérias conseguem transformar o nitrogênio atmosférico em formas nitrogenadas assimiláveis pelos vegetais.

O complexo enzimático responsável pela fixação biológica do nitrogênio – a dinitrogenase – é formado por duas subunidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), capazes de transportar elétrons. Há, ainda, uma terceira molécula auxiliar transportadora de elétrons, a ferridoxina. Essas três moléculas estão envolvidas em uma cadeia de doação-recepção de elétrons (ferridoxina → Fe-proteína → MoFe-proteína), que culmina no acúmulo de oito elétrons pela MoFe-proteína e na redução do N_2 à NH_3 (Ribeiro, 2011).

A fixação biológica do nitrogênio, realizada por microrganismos nativos ou naturalizados presentes no solo, ou por bactérias introduzidas via inoculantes contendo estirpes selecionadas para cada tipo de cultura, pode suprir, total ou parcialmente, a demanda deste elemento pelas plantas (Zakhia & de Lajudie, 2001).

Em todo o mundo, estima-se que 44 a 66 milhões de toneladas de N_2 são fixadas por leguminosas de importância agrônômica anualmente, com outras 3 a 5 milhões de toneladas fixadas por leguminosas em ecossistemas naturais, quantias que, se somadas, fornecem quase metade de todo o N utilizado na agricultura (Hungria et al., 2006; Graham & Vance, 2003).

O retorno do nitrogênio aos solos também pode ser alcançado pelo uso de fertilizantes nitrogenados. Contudo, a eficiência da fertilização nitrogenada raramente alcança 60%, e o custo pode representar até 40% do custo total da produção. Com o preço da ureia a US\$ 0,68 kg^{-1} (RURALBR, 2012), o custo da aplicação de fertilizantes nitrogenados é muito alto (Hungria et al., 2005a). Tais insumos apresentam também alto custo ambiental, pois, em média, são gastos seis barris de petróleo para a síntese de uma tonelada de amônia (Crispino et al., 2001). Além disso, o processo de lixiviação de formas nitrogenadas presentes no solo polui rios e lagos, e a desnitrificação, que afeta a camada de ozônio, também resulta em prejuízos ambientais causados pela utilização de fertilizantes nitrogenados nas

lavouras (DePolli & Franco, 1985; Campo & Hungria, 2000). Machado e Magnavaca consideraram estes insumos como a maior fonte de poluição ambiental dos sistemas agrícolas (Machado & Magnavaca, 1991).

Em contrapartida, a fixação biológica do nitrogênio é um importante fator de competitividade do setor agrícola brasileiro. Produtos inoculantes contendo bactérias diazotróficas tem sido amplamente utilizados, principalmente na cultura de soja (bactérias do gênero *Bradyrhizobium*), onde podem substituir totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados, a um custo total muito mais baixo (Crispino et al., 2001). Grande variedade de genótipos vegetais de importância agrícola foi melhorada para que fosse possível a diminuição do uso de insumos químicos. Assim, foram obtidas variedades selecionadas com maior capacidade de produção em solos pobres, e capazes de se associar aos microrganismos diazotróficos existentes no solo ou na rizosfera, para a obtenção de nitrogênio. O mercado de inoculantes agrícolas para plantas leguminosas movimentava milhões de dólares anualmente (Silva, 2006). Segundo a Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), no ano de 2011, foram vendidas aproximadamente 19,3 milhões de doses de inoculantes no Brasil, somente entre as empresas afiliadas (ANPII, 2012).

A FBN tem recebido ainda mais destaque dentro do cenário agrícola brasileiro, por fazer parte de uma das metas do Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura (Plano ABC – Agricultura de Baixo Carbono), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esse plano faz parte de um compromisso voluntário assumido pelo governo brasileiro em 2009, durante a 15ª Conferência das Partes (COP-15), de reduzir entre 36,1% e 38,9% as emissões de gases de efeito estufa (GEE) projetadas para 2020, estimando o volume de redução em torno de um bilhão de toneladas de CO₂ (MAPA, 2012). O Programa ABC tem por finalidade organizar e planejar ações a serem realizadas para a adoção de tecnologias de produção sustentáveis, possibilitando a viabilização das reduções de GEE voluntariamente propostas. Entre as metas propostas pelo Programa ABC, descritas no artigo 6º do Decreto nº 7.390 de 9 de dezembro de 2010 (Presidência da República, 2010), está “Expansão da adoção da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) em 5,5 milhões de hectares de áreas de cultivo, em substituição ao uso de fertilizantes nitrogenados”.

A FBN, através da inoculação com estirpes selecionadas para maior eficiência, representa uma tecnologia viável e de baixo custo para o aumento da produção, sem necessidade do aumento das áreas de cultivo e com impacto ambiental reduzido, substituindo, pelo menos parcialmente, a necessidade da adubação nitrogenada (e possivelmente de outros nutrientes), resultando em economia e benefícios para o produtor.

2.5 MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

2.5.1 Diazotróficos Simbióticos: Microsimbiontes da Soja

Baseado no aprimoramento das técnicas de classificação de microrganismos que ocorreu a partir da década de 1960, Graham, em 1964, dividiu os rizóbios em dois grupos: os de crescimento lento e os de crescimento rápido (Graham, 1964). Os microrganismos de crescimento lento, inicialmente chamados de *Rhizobium japonicum*, foram reclassificados posteriormente em um novo gênero: *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982). Além do crescimento lento, os bradirrizóbios caracterizam-se pela alcalinização de meios de cultura contendo manitol como fonte de C durante seu crescimento, sendo algumas espécies hospedeiro-específicas, enquanto outras são promíscuas. O RNA ribossomal do gênero é altamente conservado, sendo extremamente difícil usá-lo como indicador de diversidade de espécies dentro do grupo (Rivas et al., 2009). Inicialmente, o gênero possuía somente uma espécie definida, *B. japonicum* (Jordan, 1982). Com o passar dos anos e o aprimoramento das técnicas de identificação, novos isolados foram avaliados, e espécies novas foram descritas, provenientes de raízes de diversas leguminosas. Contudo, as espécies de *Bradyrhizobium* nem sempre são simbióticas, por exemplo, *B. betae* foi isolada de tumores de raiz de beterraba (*Beta vulgaris* L.), dispondo de um status simbiótico ainda desconhecido (Rivas et al., 2009).

Atualmente, este gênero apresenta treze espécies descritas: *B. japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *B. liaoningense* (Xu et al., 1995), *B. yuanmingense* (Yao et al., 2002), *B. betae* (Rivas et al., 2004), *B. canariense* (Vinuesa et al., 2005), *B. denitrificans* (van Berkum et al., 2006), *B. iriomotense* (Islam et al., 2008), *B. jicamae* (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B.*

pachyrhizi (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B. cytisi* (Chahboune et al., 2011), *B. lablabi* (Chang et al., 2011), e *B. huanghuaihaiense* (Zhang et al., 2012).

Dentre estas, *B. liaonigense* é conhecida por nodular plantas de soja apenas. Já *B. japonicum* e *B. elkanii*, além de soja, já foram isolados em nódulos em raízes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.)) e feijão-mungo (*Vigna radiata* (L.)) (Menna et al., 2006; Rivas et al., 2009). Sendo a soja uma cultura exótica no Brasil, os solos brasileiros originalmente não possuíam simbioses fixadores de nitrogênio para essa cultura (Loureiro et al., 2006). Uma possibilidade amplamente aceita é a de que os atuais bradirrízobios simbioses da soja presentes no país tenham chegado aderidos às primeiras sementes de soja, provindas dos Estados Unidos (Giongo, 2007). Com a inoculação massiva nas últimas décadas, a população destes microrganismos no solo aumentou significativamente (Ferreira & Hungria, 2002).

2.5.1.1 A Espécie *B. japonicum*

A espécie *B. japonicum* foi descrita por Jordan, juntamente com o gênero *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), sendo um microrganismo endosimbionte de soja, feijão-mungo, feijão-caupi e siratro (*Macroptilium atropurpureum*) (Lang et al., 2008).

É uma espécie bacteriana Gram-negativa, não formadora de esporos, e móvel através da presença de flagelo polar ou subpolar (Jordan, 1982). Costuma ser ácido-tolerante (pH 4,5), não crescendo em ambientes com salinidade superior a 2% NaCl. É comum a produção de penicilinas e bacteriocinas (Jordan, 1982). Possui metabolismo tipicamente quimiorganotrófico, sendo a glicose preferencialmente utilizada pela via Entner-Doudoroff. Porém, em presença de H₂, CO₂ e baixos níveis de O₂, pode apresentar comportamento quimiolitotrófico (Jordan, 1982). O complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela FBN, é ativo em células de *B. japonicum* de vida livre ou simbióticas, em ambientes com reduzida tensão de oxigênio. A composição dos exopolissacarídeos (EPS) secretados por esta espécie é conhecidamente de natureza acídica e heterogênea, contendo ácido D-galacturônico e açúcares metilados, que mudam conforme a idade da colônia (Mort & Bauer, 1980). EPS secretados por rizóbios em geral tem um importante papel nos processos de infecção e nodulação, possivelmente devido ao

reconhecimento destas moléculas pelas lectinas presentes nos pelos radiculares das plantas hospedeiras (Tuly, 1988).

A estirpe USDA 110 de *B. japonicum* foi originalmente isolada de nódulos de soja, na Flórida, EUA, em 1957, e é utilizada em inoculantes microbianos em vários países até os dias de hoje. Devido à sua importância agrônômica e econômica, essa estirpe teve seu genoma sequenciado, mostrando que este é composto por um único cromossomo circular contendo 8.317 genes, 9.105.828 pares de bases, e conteúdo GC de 64,1%, não apresentando plasmídeos (Kaneko et al., 2002).

Os genes responsáveis pela simbiose com leguminosas em *B. japonicum* estão agrupados em regiões cromossômicas denominadas “ilhas simbióticas”. O fato das informações necessárias à efetivação da simbiose e fixação do nitrogênio estarem inseridas dentro do cromossomo torna-se benéfico do ponto de vista agrônômico, pois as chances da informação ser perdida quando a bactéria sofrer algum estresse tornam-se menores. A estirpe USDA 110 possui uma grande ilha genômica de 410 kb, de baixo conteúdo GC, que carrega os genes simbióticos (Kaneko et al., 2002; Itakura et al., 2009), além de 14 outras pequenas ilhas genômicas em diferentes pontos de inserção no genoma, produzindo cópias variantes de genes (Kaneko et al., 2002). Essas observações suportam a hipótese da grande plasticidade do genoma de *B. japonicum*, já que infere-se que ilhas genômicas são regiões de DNA horizontalmente adquiridas ou recombinadas (Dobrindt et al., 2004; Kaneko et al., 2002). As ilhas genômicas geralmente apresentam muitos genes funcionais, que codificam proteínas envolvidas na patogenicidade, degradação de xenobióticos, captação de ferro, resistência a antibióticos, metabolismo secundário ou simbiose (Dobrindt et al., 2004).

Entre as características citadas acima, já foi descrito para a estirpe USDA 110 a habilidade de utilizar sideróforos (moléculas quelantes de ferro), provenientes de outros organismos em ambientes deficientes neste elemento, conferindo grande vantagem adaptativa a esses microrganismos quando em vida livre (Plessner et al., 1993). Essa estirpe também secreta EPS de natureza acídica, em quantidades que variam com a fonte de carbono disponível (Tully, 1988).

Entre todas as espécies que fixam nitrogênio, *B. japonicum* é considerada aquela com maior importância agrônômica no mundo, principalmente pelo fato de formar nódulos eficientes em cultivos de soja, que detem alto valor no

mercado internacional (Kaneko et al., 2002). A partir de 1992, as estirpes SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7) de *B. japonicum* foram autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil, juntamente com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, pertencentes à espécie *B. elkanii* (Hungria et al., 2006).

2.5.2 *Azospirillum* spp. e a Promoção do Crescimento de Plantas

O gênero *Azospirillum* pertence a uma classe de microrganismos que são classificados como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), mas que também carrega a propriedade importante de fixação biológica do nitrogênio (Hungria et al., 2010). As BPCP estabelecem uma relação com diversas plantas hospedeiras, trazendo uma ampla gama de benefícios a estas, como fixação biológica do nitrogênio (Huergo et al., 2008), aumento da atividade da enzima nitrato redutase (Cassán et al., 2008), síntese de hormônios vegetais, como auxinas (Crozier et al., 1988), citoquininas (Tien et al., 1979), giberelinas (Bottini et al., 1989) e etileno (Strzelczyk et al., 1994), solubilização de fosfato (Rodríguez et al., 2004), e excreção de controladores biológicos contra patógenos (Correa et al., 2008).

O gênero *Azospirillum* foi descrito por Tarrand e colaboradores em 1979 (Tarrand et al., 1979), e hoje compreende quinze espécies: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (Tarrand et al., 1979), *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. largomobile* (Skerman et al., 1983; corrig. Ben Dekhil et al., 1997), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), *A. doebereinae* (Eckert et al., 2001), *A. oryzae* (Xie & Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng et al., 2006), *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a), *A. zae* (Mehnaz et al., 2007b), *A. rugosum* (Young et al., 2008), *A. picis* (Lin et al., 2009), *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010), e *A. formosense* (Lin et al., 2012).

Espécies de *Azospirillum* são encontradas em praticamente todo o planeta, colonizando plantas em diferentes habitats (Döbereiner & Pedrosa, 1987). Estirpes já foram encontradas em associação com diversas monocotiledôneas - milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras, entre outras (Döbereiner et al., 1976; Wong & Stenberg, 1979; Rennie, 1980; Haahtela et al., 1981; Reinhold et al., 1986) - e dicotiledôneas – *Opuntia* sp. (Rao & Vankateswarlu, 1982), muitas das quais de interesse agrônômico e ecológico. Existem significativos trabalhos

demonstrando que mais de 100 espécies vegetais respondem positivamente à inoculação com estirpes de *Azospirillum* (Bashan et al., 2004).

O mais provável é que os benefícios dessa associação resultem de uma combinação de diversos fatores (Hungria et al., 2010). Acredita-se que *Azospirillum* spp. produzam fitohormônios e reguladores de crescimento que induzem o crescimento das raízes e, conseqüentemente, a maior absorção de água e minerais do solo (Okon & Kapulnik, 1986), assim como aumento da biomassa da parte aérea (Steendhoudt & Vanderleyden, 2000), além de aumentar a resistência a estresse hídrico e salino, produzindo plantas mais vigorosas (Hungria et al., 2010). Além disso, este gênero é capaz de fixar nitrogênio atmosférico em associação com diversas plantas não leguminosas (Döbereiner & Day, 1976). Porém, por não serem simbióticos, como os rizóbios, mas sim de vida livre, associativos, há certa limitação em sua capacidade de secretar e transferir nitrogênio às plantas às quais se associam (Huergo et al., 2008). Em muitos casos, a inoculação com *Azospirillum* diminui o uso de fertilizantes químicos, especialmente N, em 20%-50%, em média (Bashan et al., 2004). Além disso, a inoculação com *Azospirillum* pode, indiretamente, suprimir alguns patógenos, através da competição entre espécies bacterianas, aumento da resistência da planta à infecção patogênica, e pela produção de substâncias antimicrobianas (Bashan et al., 2004).

Diversos trabalhos já publicados evidenciam os benefícios da associação *Azospirillum*-plantas. Saubidet e colaboradores, em 2002, observaram que plantas de trigo inoculadas com *A. brasilense* obtiveram peso seco de parte aérea duas vezes maior do que as plantas controle não inoculadas, assim como maior teor de N total e grãos com maior concentração proteica (Saubidet et al., 2002). Em outro trabalho, Rodrigues e colaboradores (2008) obtiveram aumento de massa seca de grãos, número de panículas e acúmulo de N em plantas de arroz inoculadas com *A. amazonense* (Rodrigues et al., 2008). Plantas não pertencentes à família das gramíneas, como algodão (*Gossypium hirsutum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), também podem ser inoculadas com *Azospirillum*, apresentando bons resultados (Bashan & Levanony, 1991). Alguns trabalhos relatam aumento de matéria seca, circunferência de caule, número de folhas, altura da planta, e densidade e comprimento de pelos radiculares de tomateiros inoculados (Bashan et al., 1989; Bashan, 1998), provavelmente devido ao aumento nos níveis de AIA (ácido-indol-acético) e etileno liberados pela bactéria.

Diversos ensaios a campo, em diferentes culturas, inoculadas com diferentes estirpes de *Azospirillum*, mostraram que essas bactérias são capazes de promover aumentos na produção, em diferentes solos e climas (Saubidet & Barneix, 1998), bem como inibição de crescimento em outros casos. Essa variabilidade de resultados de inoculação em experimentos a campo sugere que uma importante associação ambiente-bactéria-planta deve existir (Saubidet et al., 2002), tendo certos fatores abióticos, como aporte de N (Vande Broek et al., 1993), pH do solo (New & Kennedy, 1989) e condições do solo (Bashan, 1999), importância crucial na colonização das raízes das plantas hospedeiras pela bactéria. Infere-se que 60%-70% dos estudos de inoculação com *A. lipoferum* e *A. brasilense* obtiveram sucesso, embora somente em 5%-30% dos casos, as respostas tenham sido significativas (Rodrigues et al., 2008).

Um fenômeno notável quando se fala na inoculação com *Azospirillum* é que esta se torna mais lucrativa e eficiente quando outros microrganismos são co-inoculados (Bashan & Holguin, 1997). A co-inoculação parece funcionar bem com bactérias solubilizadoras de fosfatos, *Azotobacter*, rizóbios, *Bacillus* e alguns fungos, provavelmente em função da disponibilização sinérgica de nutrientes e pela remoção de produtos inibidores (Bashan et al., 2004). Entre os principais benefícios da co-inoculação figuram o aumento na captação de nutrientes, redução do uso de fertilizantes de N e P em 25%-50%, aumento da disponibilidade de NPK no solo, e melhor custo-benefício (Bashan et al., 2004). Dardanelli e colaboradores encontraram um efeito geral positivo na co-inoculação de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com *Azospirillum-Rhizobium* na expressão de genes ligados à nodulação durante estresse salino (Dardanelli et al., 2008). Do mesmo modo, Groppa e colaboradores co-inocularam *Azospirillum* e *B. japonicum* em plantas de soja obtendo uma maior nodulação, aumento de massa seca de raiz e parte aérea, assim como maior número de pelos radiculares (Groppa et al., 1998).

Segundo Rodrigues e colaboradores (2008), os extensivos estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos realizados atualmente sobre o gênero *Azospirillum*, caracterizam-no como sendo o mais bem estudado gênero entre os associativos promotores do crescimento de plantas (Rodrigues et al., 2008). Em função de todos os benefícios já observados a plantas de interesse econômico, a inoculação com *Azospirillum* mostrou um grande potencial como ferramenta agrobiotecnológica, o que promoveu o surgimento, recentemente, de um mercado

promissor, através da geração de um inoculante que pode ser utilizado em gramíneas, forrageiras e grãos.

2.6 INOCULANTES

2.6.1 Inoculantes Contendo Rizóbios para Soja

A inoculação de plantas com bactérias benéficas é uma prática antiga (Bashan, 1998). No final do século 19, a prática de misturar solos contendo populações bacterianas naturalmente estabelecidas a sementes de leguminosas já era recomendada nos Estados Unidos (Smith, 1992), e a primeira patente de *Rhizobium* sp. para a inoculação de plantas foi registrada em 1896 (Nobbe & Hiltner, 1896). A partir daí, a prática de inoculação de soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tornou-se comum e economicamente vantajosa em muitos países, principalmente na América do Sul (Penna et al., 2011). No Brasil, a primeira produção e distribuição de produto inoculante para leguminosas foi realizada na década de 1930, em São Paulo (Lopes & Giardini, 1981), com o início da produção industrial na década de 1960 (Freire & Vidor, 1981).

Diversos esforços de seleção de estirpes eficientes e adaptadas aos solos brasileiros foram feitos desde então (Peres, 1979; Freire & Vidor, 1981; Vargas et al., 1981; Vargas et al., 1992; Hungria & Vargas, 1996). Tais estirpes, quando inoculadas de maneira correta, podem substituir totalmente a adubação nitrogenada na soja cultivada no país, promovendo ganhos significativos na produção de grãos, quando comparada com sementes não inoculadas (Peres et al., 1993; Hungria & Vargas, 1996; Hungria et al., 1997; Campo & Hungria, 1999; Campo & Hungria, 2001; Campos et al., 2001; Loureiro et al., 2001; Campo et al., 2002; Vargas et al., 2002).

Atualmente, na maioria dos países sul-americanos, incluindo o Brasil, grande parte da soja é cultivada sem a adição de fertilizantes nitrogenados, sendo o nitrogênio necessário à cultura proveniente, em sua maior parte, da fixação biológica do nitrogênio realizada pelas bactérias inoculadas e nativas do solo. Em 2010, 80% da produção de soja da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (16 milhões de hectares) foi inoculada com produtos pertencentes a mais de 100 empresas distintas (Penna et al., 2011). Como consequência dos resultados

positivos obtidos no cultivo de soja inoculada, e com a expansão das áreas cultivadas, o número de doses de produtos inoculantes vendidas tem crescido no Brasil (Hungria et al., 2006). Estima-se que anualmente, 60% dos produtores de soja brasileiros utilizem a inoculação e a reinoculação em detrimento de fertilizantes nitrogenados em suas culturas, já que os custos de transporte e entrada destes insumos no Brasil são altos e sua eficiência é baixa, onerando a produção (Hungria et al., 2006).

A inoculação tradicional de leguminosas consiste em transferir bactérias fixadoras do nitrogênio do produto inoculante para a superfície das sementes, que durante a germinação e desenvolvimento da plântula, infectarão a mesma, levando à formação de nódulos no sistema radicular, por onde a planta obterá o nitrogênio indispensável ao seu desenvolvimento.

Quanto maior o número de bactérias inoculadas na semente, maior a competição com as populações bacterianas já existentes no solo, resultando na formação de nódulos com as estirpes introduzidas pelo inoculante, as quais foram selecionadas para serem mais eficientes no processo de FBN. Além disso, a presença de bactérias inoculadas favorece a formação de nódulos maiores nas raízes principais e na coroa radicular, que fixam maior quantidade de N do que os nódulos localizados nas raízes secundárias (Henning et al., 1997).

A eficiência da FBN em leguminosas inoculadas, especialmente em regiões tropicais é afetada negativamente por fatores edafoclimáticos, assim como práticas de manejo e o tratamento de sementes com fungicidas (Hungria et al., 2007). No Brasil, estima-se que 90% das sementes de soja sejam tratadas com fungicidas, elevando a taxa de mortalidade bacteriana à 70% ou mais, já a duas horas após a inoculação e o contato com os fungicidas presentes nas sementes, reduzindo assim, a nodulação em condições de campo (Hungria et al., 2005b). Trabalhos anteriores mostram que a nodulação de soja em campo também pode ser afetada pela adição de micronutrientes na sementes, como molibdênio (Mo) e cobalto (Co), necessários ao cultivo de soja em solos tropicais, onde o pH é naturalmente ácido, o que torna estes nutrientes indisponíveis às plantas (Hungria et al., 2005b). A nodulação satisfatória depende, também, do veículo inoculante propiciar condições de sobrevivência e proteção para a bactéria, proporcionando a manutenção de grande número de células viáveis até o momento do surgimento das raízes (Deaker et al., 2004). Em função de todas estas situações onde a nodulação

da soja pode ser negativamente afetada, estratégias foram desenvolvidas no sentido de aumentar a compatibilidade do tratamento de sementes com a inoculação. Entre estas estratégias, incluem-se a recomendação de um alto número de células bacterianas por semente (recomenda-se, atualmente, 1.200.000 céls./semente), inoculação no sulco de semeadura, aplicação de micronutrientes após a germinação, e desenvolvimento de sementes ricas em Mo (Hungria et al., 2005b).

Os inoculantes para soja no Brasil são formulados com a combinação aleatória, ou individualmente, das quatro estirpes recomendadas, (espécie *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5079 e SEMIA 5080; espécie *B. elkanii*, SEMIA 587 e SEMIA 5019), consideradas as mais eficientes pela pesquisa brasileira e autorizadas pelo MAPA, com concentração mínima de 1×10^9 UFC/g ou mL, e ausência de microrganismos contaminantes na diluição 10^5 , conforme Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011).

Os inoculantes comercializados no Brasil possuem dois tipos de suporte: líquido ou sólido (à base de turfa). Por muito tempo, a turfa foi considerada o suporte mais adequado, por possibilitar a manutenção de número elevado de bactérias viáveis e oferecer proteção física aos microrganismos (Lupwayi et al., 2005). Contudo, a ausência de turfeiras adequadas à produção de inoculantes no Brasil, levando à importação desse substrato, associada à grande variabilidade nas propriedades físicas e químicas das turfas, que gera a necessidade de homogeneização, acabam elevando o custo desse tipo de inoculante (Zilli et al., 2010).

As formulações líquidas de inoculantes inicialmente apresentavam baixo desempenho em condições de clima tropical (Hungria et al., 2006). Assim, a identificação de protetores celulares que, adicionados ao inoculante, promovem a proteção contra o estresse, tornou-se um fator importante no desempenho simbiótico, aumentando a eficiência dos produtos de base líquida (Hungria et al., 2005b). Esse tipo de formulação se mostra adequado a aplicação em grandes plantios, por facilitar a semeadura mecanizada (Lupwayi et al., 2005).

2.6.2 Uso de *Azospirillum Brasilense* em Inoculantes no Brasil

Por ter uma distribuição mundial, a inoculação com espécies de *Azospirillum* pode ser utilizada em plantas adaptadas a diversos climas, inclusive em

regiões desérticas e solos salinos (Barassi et al., 2008). Inoculantes contendo *Azospirillum* já foram testados em diversas culturas, sob condições de campo, em muitos países, com diversos graus de respostas, mas o sucesso da inoculação depende de um fator chave, a escolha da estirpe a ser utilizada (Hungria et al., 2010). Deve-se considerar, também, que efeitos do genótipo da planta hospedeira na interação com *Azospirillum* já foram demonstrados, por exemplo, para o trigo (Caballero-Mellado et al., 1992) e para o milho (Garcia de Salamone et al., 1996).

Em cereais e grãos de interesse agrônômico, como milho, a inoculação com bactérias da espécie *A. brasilense* pode promover o desenvolvimento do sistema radicular, com aumento da densidade, número e comprimento de pelos radiculares. Isso permite a exploração de um maior volume de solo, incrementando, assim, a absorção de água e nutrientes. Há, também, um aumento significativo na resistência da planta ao estresse hídrico e na respiração radicular, através da ativação de enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico (Huergo et al., 2008). Além disso, há relatos de aumento no diâmetro do caule e largura da folha de milho inoculado. *A. brasilense* também acelera a mobilização do nitrogênio na semente, e induz o crescimento das plântulas e o florescimento precoce, além de aumentar a resistência contra patógenos (Huergo et al., 2008).

Hungria e colaboradores (2010) testaram a inoculação de estirpes de *Azospirillum* em milho e trigo, obtendo resultados significativos no desenvolvimento destas culturas, quando utilizadas algumas estirpes pertencentes às espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum*. As estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 aumentaram o desenvolvimento de plantas de milho e trigo em 27% e 31%, respectivamente, resultando na identificação das primeiras estirpes de *Azospirillum* a serem recomendadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (Hungria et al., 2010).

2.7 METABÓLITOS MICROBIANOS SECUNDÁRIOS

O conjunto bem conhecido de reações químicas e processos catabólicos e anabólicos essenciais ao crescimento celular e altamente conservados entre as espécies, gêneros e reinos é denominado metabolismo primário (O'Brien & Wright, 2011).

Por outro lado, certas plantas e diversos microrganismos sintetizam diversos compostos especiais, que apresentam, na maioria dos casos, estruturas químicas diferentes daquelas encontradas nos produtos do metabolismo primário, intimamente relacionadas entre si, e que têm por característica principal não serem essenciais ao crescimento e à reprodução do organismo (Madigan et al., 2008). É o chamado metabolismo secundário. Metabólitos secundários são moléculas naturais de adaptação, que envolvem funções distintas do metabolismo primário (O'Brien & Wright, 2011). Em sua maioria, os metabólitos secundários são compostos por moléculas orgânicas complexas, cuja síntese requer um grande número de reações enzimáticas específicas (Madigan et al., 2008).

Entre as estruturas químicas mais encontradas entre os metabólitos secundários figuram anéis β -lactâmicos, peptídeos cíclicos, aminoácidos não-proteicos, açúcares e nucleosídeos não usuais, poliacetilenos insaturados, grupos nitrila, triésteres cíclicos, terpenoides, grandes anéis de macrolídeos, entre muitos outros (Demain & Fang, 2000). Apesar de não fazerem parte do metabolismo primário, as vias metabólicas do metabolismo secundário decorrem do metabolismo primário, uma vez que os compostos iniciais utilizados no metabolismo secundário originam-se das principais vias biossintéticas (Madigan et al., 2008).

Mesmo não sendo peças-chave para o crescimento e desenvolvimento do organismo, os metabólitos secundários exercem diversas funções, como (Davies, 1992):

- a) Estruturas de defesa contra agentes externos, sejam eles fungos, bactérias (antibióticos), plantas, insetos ou animais de grande porte;
- b) Estruturas transportadoras de metais;
- c) Moléculas que propiciam a simbiose entre microrganismos e plantas, nematoides, insetos e animais superiores;
- d) Hormônios sexuais;
- e) Estruturas de diferenciação intra e extra celulares;
- f) Promotores de crescimento microbiano e de plantas.

Os metabólitos secundários microbianos incluem moléculas de antibióticos, pigmentos, toxinas, efetores de competição ecológica e simbiose, feromônios, enzimas inibitórias, agentes imunomoduladores, receptores

antagonistas e agonistas, pesticidas, agentes anti-tumorais e promotores de crescimento de animais e plantas (Demain, 1998). Acredita-se que os metabólitos secundários sejam mais comuns em organismos de organização corporal mais simples, que não possuem sistema imune (Maplestone et al., 1992). A síntese desses compostos é extremamente dependente das condições ambientais e de crescimento (Madigan et al., 2008) e, geralmente, são codificados por genes agrupados no DNA cromossomal ou, menos frequentemente, no DNA plasmidial (Demain, 1998).

De modo geral, os metabólitos secundários são produzidos por espécies ou gêneros específicos, por razões fisiológicas, sociais ou predatórias, estando intimamente ligados à ecologia dos organismos (O'Brien & Wright, 2011). Geralmente, as vias metabólicas secundárias são ativadas em situações de déficit nutricional, biossíntese, ou presença de indutor (geralmente de baixo peso molecular), e/ou por diminuição da taxa de crescimento microbiano. Tais eventos geram sinais que impulsionam uma cascata de eventos regulatórios, resultando em diferenciações químicas, que ativam as vias biossintéticas secundárias (Demain, 1998). Infere-se que a limitação nutricional é a situação usual na natureza que resulta na diminuição drástica das taxas de crescimento bacteriano e, conseqüentemente, favorece a produção de metabólitos secundários (Demain & Fang, 2000).

Estima-se que o número de metabólitos microbianos secundários descobertos até o momento varie de 8000 a 50000 (Omura, 1992; Reichenbach & Höfle, 1993; Berdy, 1996). Essa grande distribuição natural da produção de metabólitos secundários e suas rotas biossintéticas multigênicas indica que tais moléculas possuem funções de aumento de sobrevivência nos organismos que as produzem (Demain & Fang, 2000).

Em função da ampla gama de atividades biológicas, os metabólitos secundários adquiriram importância industrial potencial (González et al., 2003). Em condições ambientais e de crescimento bacteriano controladas, em escala industrial, pode haver superprodução dos compostos secundários (Madigan et al., 2008).

Entre os microrganismos rizosféricos, destacam-se os antimicrobianos, exopolissacarídeos, lipoquitooligosacarídeos e fitohormônios como alguns dos principais metabólitos secundários produzidos.

2.7.1 Antimicrobianos

A produção de moléculas antimicrobianas (antibióticas) derivadas do metabolismo secundário é amplamente distribuída nos microrganismos. Estima-se que 40% dos fungos filamentosos e actinomicetos produzam antibióticos quando isolados da natureza (Demain & Fang, 2000). Além disso, Foster e colaboradores descrevem que 77% de myxobactérias de solo apresentam atividade antibiótica contra *Micrococcus luteus*, além de possuírem atividade antifúngica e, em algumas espécies, antibióticos contra bactérias Gram-negativas (Foster et al., 1992). A produção de antibióticos por microrganismos está intimamente associada ao fato de que tais moléculas aumentam a vantagem seletiva do produtor em ambientes pobres em nutrientes, por possuírem a capacidade de matar competidores vizinhos (O'Brien & Wright, 2011). Exatamente por essa razão, bactérias isoladas de ambientes naturais (solos e águas, principalmente) tendem a ser altamente resistentes a antibióticos (D'Costa et al., 2006; Dantas et al., 2008).

Entre os agentes antimicrobianos produzidos por bactérias, estão as chamadas bacteriocinas (Mourad et al., 2009). Tais bacteriocinas são compostos proteicos secundários, ativos contra bactérias intimamente relacionadas com a bactéria produtora (Riley & Werts, 2002). Muitos estudos tem revelado a ação de bacteriocinas contra fitopatógenos (Osnat et al., 2005; Kacem, 2007; Holtsmark et al., 2008). O potencial de produção destes compostos por bactérias Gram-negativas tem sido estudado, com o objetivo de utilização como controle biológico contra fitopatógenos, frente ao aumento da resistência destes microrganismos a antibióticos industriais (McManus et al., 2002).

Diversos tipos de bacteriocinas produzidas por rizóbios tem sido descritos (Gross & Vidaver, 1978; Schwinghamer & Brockwell, 1978; Schripsema et al., 1996), sendo denominadas rizobiocinas (Hirsch, 1979; Sridevi & Mallaiah, 2008). Entretanto, as propriedades das rizobiocinas e seus efeitos em bactérias fitopatogênicas permanecem pobremente documentadas, e o potencial de utilização industrial de antimicrobianos produzidos por *Rhizobium* sp. não foi completamente explorado (Mourad et al., 2009). A produção de bacteriocinas e a competição inter-específica parecem estar intimamente relacionadas. O incremento na pesquisa na área das bacteriocinas poderá revelar novas rotas, alvos e alternativas para o controle de doenças em vegetais (Mourad et al., 2009).

2.7.2 Exopolissacarídeos Protetores

Além de substâncias antimicrobianas, certas bactérias possuem a capacidade de produção de substâncias químicas polissacarídicas, que são liberadas no meio extracelular. Uma característica que tem chamado atenção para os rizóbios é sua capacidade de sintetizar grandes quantidades destas substâncias, denominadas exopolissacarídeos (EPS), tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Apesar de terem função fisiológica não muito bem esclarecida, a produção de EPS por rizóbios pode chegar a 70% do gasto energético celular em certas condições ambientais (Castellane & Lemos, 2007), mesmo sendo muito raro uma bactéria utilizá-lo como fonte de energia (González et al., 1996). EPS são basicamente constituídos por heteropolissacarídeos espécie ou estirpe-específica, predominantemente monossacarídeos como D-glucose, D-mannose, D-ácido glucurônico e L-ramnose. Tendem a ter uma natureza acídica, devido à presença de ácido glucurônico e outros grupos funcionais carregados negativamente (Staudt, 2009).

Estudos com diversas espécies de *Rhizobium* demonstraram que os EPS teriam um papel bastante importante na interação entre a leguminosa hospedeira e a bactéria, atuando na sinalização celular de ambos os organismos (Kirichenko et al., 2004; Becker et al., 2005), funcionando como molécula receptora do micro-simbionte, promovendo uma interação célula-célula e desencadeando o processo de nodulação (Kirichenko et al., 2004). EPS atuam na formação de nódulos e micro-colônias (Nicolás, 1996), aumentando a adesão da bactéria e promovendo seu crescimento nos espaços intercelulares necessários tanto para a nodulação, como para a organogénia da raiz (Kosenko et al., 2001), e agindo como sinais moleculares durante o desenvolvimento do nódulo (Kosenko et al., 2001). Infere-se, ainda, que os EPS participariam ativamente da proteção da bactéria a estresses ambientais, como dessecação, oscilações osmóticas e de pH (Castellane & Lemos, 2007), bem como de predação e ataques de moléculas antimicrobianas (Staudt et al., 2012), entre outros.

A espécie *B. japonicum* produz, conhecidamente, dois tipos de EPS, de natureza acídica: 1) EPS tipo A, composto por unidades repetidas de pentassacarídeos, com uma estrutura de dois resíduos de glicose, um resíduo de manose e um resíduo de ácido galacturônico, e uma cadeia lateral que contém um resíduo de galactose ou 4-O-metil galactose (Mort & Bauer, 1982); 2) EPS tipo B,

composto por unidades repetidas de tetrassacarídeos, com uma estrutura de três resíduos de rhamnosil e uma cadeia lateral que contem um resíduo de ácido 4-O-metil glucorônico (Dudman, 1978). Já a estrutura dos EPS produzidos pela espécie *R. tropici*, estirpe CIAT 899, são descritos como sendo compostos por unidades repetidas de octassacarídeos compostos por seis moléculas de D-glucose, duas moléculas de D-galactose, três moléculas de ácido pirúvico e uma molécula de ácido acético. Metade dos grupos terminais de 4,6-galactose na posição 3 é substituída por ácido pirúvico e a outra metade é substituída por grupos acetil O-acetil (Oliveira et al., 2012).

Além da variação entre espécies e gêneros, a composição de EPS pode variar conforme mudanças nas condições ambientais que circundam a célula em determinado momento. Fatores ambientais ou condições específicas da cultura podem impactar dramaticamente a composição química do polissacarídeo a ser formado. São tidos como fatores críticos, mas não os únicos, para a produção de EPS: fase de crescimento bacteriano, fontes de carbono e nitrogênio disponíveis, taxa de oxigenação, temperatura e pH (Staudt, 2009).

Atualmente, exopolissacarídeos de diversas espécies bacterianas estão sendo comercializados como biopolímeros usados em emulsificantes, estabilizantes, coagulantes e agentes de suspensão em diversos setores da indústria. Para rizóbios, porém, não há nenhuma utilização comercial da grande quantidade de EPS produzida pelas espécies em condições de cultivo controladas. Newman e colaboradores propuseram a utilização destes compostos como condicionadores de solos pobres, já que alterariam as propriedades físicas destes, como permeabilidade, coesão e retenção de água (Newman et al., 2010).

2.7.3 Fatores NOD (LCOs)

A simbiose entre dois organismos é a forma ubíqua de inovação evolutiva que possui a mais complexa arquitetura biológica e química do planeta (Margulis & Fester, 1991; Woyke et al., 2006). No caso dos rizóbios, a simbiose bactéria-planta hospedeira só é possível graças à produção de compostos secundários denominados Fatores Nod, sintetizados em resposta à transcrição do conjunto de genes de nodulação da bactéria.

Essa interação complexa e específica resulta no desenvolvimento de estruturas denominadas nódulos nas raízes (Santos & Reis, 2008), e mais raramente nos caules, das plantas (Moreira & Siqueira, 2006). Dentro dos nódulos, as bactérias assumem a forma endo-simbiótica (denominada bacteroide), que possui a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia (Broughton et al., 2006).

O processo de nodulação é extremamente complexo, com a participação de diversas moléculas-sinais (Zayas, 2005). Estes sinais permitem que as primeiras fases da formação dos nódulos (encurvamento do pelo radicular e infecção da planta pelos rizóbios) ocorram corretamente.

O primeiro sinal parte da planta hospedeira, através da secreção, pelas raízes e sementes, de moléculas indutoras. Tais moléculas são planta-específicas e podem ser da família das betaínas (estaquidrina e trigonelina), ácidos aldônicos, eritrônicos e tetrônicos (Phillips et al., 1992; Gagnon & Ibrahim, 1998), e, principalmente, da família dos flavonoides (Perret et al., 2000). Os flavonoides, além de induzirem a quimiotaxia dos rizóbios, atuam com as proteínas NodD. A interação dos flavonoides compatíveis com a proteína NodD é responsável pela ativação dos genes de nodulação na bactéria (Fisher & Long, 1993). No caso da soja, os principais flavonoides que atuam na interação planta-rizóbio são a genisteína e a daidzeína (Kosslak et al., 1987), e no feijoeiro foram descritos eriodictiol, naringenina e genisteína como os principais indutores da simbiose liberados pelas raízes (Hungria et al., 1991).

Os genes de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*) são divididos em gerais e específicos. Os gerais, denominados *nodA*, *nodB* e *nodC*, são comuns a praticamente todos os rizóbios. Já os específicos (*nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, e *nodL*) diferem entre as espécies e determinam o tipo de hospedeiro de cada estirpe (Taiz & Zeiger, 2004). Somente o gene regulador *nodD* é constitutivamente expresso, sendo o seu produto proteico, NodD, um regulador da transcrição dos demais genes *nod*. Os genes *nod*, ativados por NodD, codificam as proteínas de nodulação, cuja maioria está envolvida na biossíntese dos fatores Nod (Taiz & Zeiger, 2004).

Os fatores Nod são moléculas sinalizadoras compostas por oligossacarídeos de lipoquitina, com esqueleto formado geralmente por quatro ou cinco resíduos de *N*-acetil-D-glicosamina ligados a uma quitina, além de uma cadeia acil lipídica na posição C-2 do açúcar não-redutor. Tais cadeias acil carregam

diversas substituições, sendo estas importantes na determinação da especificidade da relação simbiótica (Gough, 2003). NodA, NodB e NodC, presentes em quase todos os rizóbios, são necessárias para a formação da estrutura básica da molécula (Stokkermans et al., 1995). Contudo, duas estirpes de *Bradyrhizobium*, ORS278 e BTAi1, não apresentam os genes *nodABC*, usando uma rota alternativa para o início da simbiose, onde um derivado de purina exerce o papel de sinalizador para o início da formação do nódulo (Giraud et al., 2007). Os genes *nod* hospedeiro-específicos estão envolvidos na modificação da cadeia acil lipídica ou na adição de grupos importantes na determinação da especificidade do hospedeiro (Taiz & Zeiger, 2004).

Em *B. japonicum*, os fatores Nod específicos são pentâmeros com cadeias de ácidos graxos C_{18:1}, C_{16:0} e C_{16:1} na extremidade não redutora, e 2-O-metilfuose na extremidade redutora da molécula (Carlson et al., 1993). No caso de *R. tropici*, simbiote de feijoeiro, leucena (*Leucaena* sp.), e outras leguminosas (Martínez-Romero et al., 1991), os fatores Nod específicos desta espécie são descritos como oligômeros pentaméricos, sulfatados ou não-sulfatados, com resíduos de *N*-metil-*N*-acil-D-glucosamina na extremidade não redutora da molécula (Poupot et al., 1993).

Após sua síntese pela bactéria, os fatores Nod são liberados e captados nos pelos radiculares da planta alvo, onde promovem uma alteração do fluxo iônico, dando início ao processo de infecção, com o encurvamento do pelo radicular e formação do cordão de infecção.

Fatores Nod purificados são ativos em raízes de leguminosas e, em concentrações muito baixas (na ordem de pico e nanomolar), induzem muitas das respostas características das bactérias (Gough, 2003). Algumas destas respostas são rápidas e localizadas, como alteração no fluxo de cálcio nas células das raízes, enquanto outras são mais lentas e englobam diversas camadas de células da raiz, como a indução de expressão gênica e a divisão celular, que culminam na formação do primórdio do nódulo. Dessa forma, os fatores Nod atuam como principais moléculas sinalizadoras da simbiose por conferir especificidade bactéria-hospedeiro, pela infecção e desenvolvimento do nódulo, e por serem suscetíveis de serem percebidos pelos receptores de alta afinidade presentes nos pelos radiculares (Cullimore et al., 2001).

De um modo geral, pode-se dividir o processo de início da nodulação em etapas, controladas em diversos níveis, sendo resumidamente:

- a) A planta hospedeira secreta diversos compostos indutores, geralmente flavonoides;
- b) A presença dos flavonoides ativa a expressão de genes reguladores da nodulação, particularmente as proteínas NodD (Perret et al., 2000);
- c) O complexo NodD-flavonoides interage com uma região promotora conservada (*nod* boxes), localizada à jusante da região onde se encontram a maioria dos genes *nod* no genoma bacteriano;
- d) A transcrição ocorre, dando origem ao produto enzimático dos genes *nod*, com a síntese e secreção dos fatores Nod (Broughton et al., 2006);
- e) Outros genes dos rizóbios são transcritos e expressos, sendo necessários à continuidade do desenvolvimento do cordão de infecção, representando um terceiro conjunto de sinais.

2.7.4 Hormônios Vegetais

Os solos são ambientes que possuem uma microbiota extremamente diversa. Estima-se que 1 m² de solo contenha, aproximadamente, 10.000 espécies microbianas (Taiz & Zeiger, 2004). Pode-se dividir o solo em duas regiões distintas: rizosférica e não rizosférica.

Chama-se rizosfera à porção do solo que sofre influência direta das raízes das plantas (Arshad & Frankenberger, 1998), sendo estas regiões muito mais diversas do que o solo não-rizosférico, visto que há um grande número de microrganismos que vivem associados às raízes. Essa comunidade microbiana é muito diversa específica e metabolicamente promovendo, assim, transformações bioquímicas importantes na região rizosférica, que acabam por afetar, positiva ou negativamente, o crescimento vegetal (Arshad & Frankenberger, 1998). A produção de metabólitos biologicamente ativos pela microbiota rizosférica, como os chamados reguladores de crescimento de plantas (RCPs), é considerada um dos mais importantes mecanismos de ação pelo qual tal microbiota afeta, direta ou indiretamente, o crescimento vegetal (Arshad & Frankenberger, 1998). RCPs são moléculas orgânicas naturais que influenciam processos fisiológicos em plantas em

concentrações extremamente baixas, sendo comumente denominados “fitohormônios” ou “hormônios vegetais” (Arshad & Frankenberger, 1998).

Infere-se que muitos grupos bacterianos rizosféricos sejam capazes de sintetizar diversos tipos de RCPs (Cacciari et al., 1989), sob diferentes condições. Condições ambientais, idade da célula e presença ou ausência de algum nutriente essencial influenciam grandemente as atividades do metabolismo secundário bacteriano, incluindo a produção de fitohormônios (Cacciari et al., 1989).

Existem cinco classes estabelecidas de RCPs:

- a) AUXINAS: encontradas principalmente na forma de ácido indol-3-acético (AIA), seus derivados halogenados, e ácido indol-3-butírico (AIB), sendo o triptofano seu principal precursor (Arshad & Frankenberger, 1998). São responsáveis pela divisão, extensão e diferenciação de células e tecidos vegetais (Bashan & de-Bashan, 2010).
- b) GIBERELINAS: ácidos diterpenóicos tetracíclicos. Embora a giberelina (AG) mais conhecida seja o ácido giberélico (AG₃), derivado de um fungo, a AG mais ativa em vegetais é a AG₁, responsável pelo alongamento do caule (Davies, 1995). Ácido mevalônico é o provável precursor das giberelinas em plantas. Também promovem a divisão e alongamento celular, porém, sem os efeitos inibitórios característicos das auxinas, além de estarem envolvidas em processos de quebra de dormência de sementes (Bashan & de-Bashan, 2010).
- c) CITOQUININAS: aminopurinas com o N6 substituído por ribosídeos, ribotídeos e glucosídeos. Tais moléculas são responsáveis por induzir a divisão celular em tecidos vegetais na presença de auxinas, representando o principal regulador da biossíntese de citoquininas. As citoquininas também atuam na morfogênese de caules e raízes, maturação de cloroplastos, aumento de volume celular, germinação de brotos e senescência (Bashan & de-Bashan, 2010). A citoquinina mais comum é a zeatina, que pode ser convertida em outras citoquininas (McGaw & Burch, 1995).

- d) ETILENO: hidrocarboneto (C_2H_4) sintetizado a partir do aminoácido metionina, geralmente em resposta a estresses. Também é conhecido como hormônio do amadurecimento, atuando desde a germinação de sementes à senescência de diversos órgãos, e ao amadurecimento de frutos (Arshad & Frankenberger, 1998).
- e) ÁCIDO ABSCÍSSICO (ABA): sesquiterpeno derivado de ácido mevalônico (Walton & Li, 1995), que pode exercer um papel tanto promotor, quanto inibidor do crescimento vegetal. Também está ligado à senescência e abscisão de frutos e folhas e em respostas da planta a estresses como seca e altas concentrações de sais, agindo no controle osmótico e no processo de abertura/fechamento de estômatos (Bashan & de-Bashan, 2010).

A presença de RCPs no solo rizosférico já foi demonstrada em diversos trabalhos (Arshad & Frankenberger, 1993; Frankenberger & Arshad, 1995). Parte desses RCPs é originária das plantas, que liberam estes compostos como exsudatos de raiz, sendo o restante proveniente de grande parte da comunidade microbiana (Arshad & Frankenberger, 1998). Barea e colaboradores (1976) descreveram que, entre 50 estirpes bacterianas isoladas de diferentes solos rizosféricos, 86%, 58% e 90% produzem auxinas, giberelinas e citoquininas, respectivamente (Barea et al., 1976). Microrganismos rizosféricos, em função de sua proximidade com diversos tipos vegetais, são mais eficientes na produção de auxinas e outros fitohormônios do que microrganismos não-rizosféricos (Sarwar & Kremer, 1995). Estudos têm demonstrado que os fitohormônios interagem antagônica ou sinergisticamente no controle do crescimento vegetal (Hussain & Hasnain, 2011).

Entre as rizobactérias diazotróficas, tanto entre as simbiontes (*Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., etc), quanto entre as BPCP de vida livre (*Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., etc), ainda é investigado se a promoção do crescimento vegetal de plantas inoculadas com tais microrganismos deve-se exclusivamente à fixação biológica do nitrogênio, à produção de RCPs, ou à combinação de ambos ou mais efeitos (Morgenstern & Okon, 1987).

A produção de RCPs como auxinas, giberelinas e citoquininas por bactérias do gênero *Azospirillum* já foi identificada em diversos trabalhos (Tien et al., 1979; Mahmoud et al., 1984; Jain & Patriquin, 1985; Barbieri et al., 1986; Pati et al., 1995; Bashan & de-Bashan, 2010). De acordo com Hubbell e colaboradores, a produção de AIA e outros fitohormônios em quantidades fisiologicamente ativas é uma característica fenotípica de muitas estirpes de *Azospirillum* (Hubbell et al., 1979). A capacidade de produzir tais substâncias em meio de cultura varia entre as estirpes de *Azospirillum*, sendo também as condições do meio de cultura, estágio de crescimento e concentração de substratos, fatores determinantes (Okon et al., 1991; Bar & Okon, 1992). Cacciari e colaboradores observaram uma grande produtividade de giberelinas e citoquininas em culturas mistas de *A. brasilense* e *Arthrobacter giacomelloi* (Cacciari et al., 1989), e Kolb e Martin detectaram produção de ácido abscísico no meio de cultura com *A. brasilense* Ft 326 (Kolb & Martin, 1985). Há diversas evidências de que plantas inoculadas com estirpes de *Azospirillum* produtoras de fitohormônios respondem positivamente à inoculação (Arshad & Frankenberger, 1998). Fulchieri e colaboradores observaram que a inoculação de *A. lipoferum* afeta a quantidade de AG em raízes de milho, mostrando que tal substância pode estar envolvida nos efeitos benéficos de *Azospirillum* spp. sobre gramíneas (Fulchieri et al., 1993).

Muitos estudos têm demonstrado que rizóbios também tem a capacidade de produzir fitohormônios, como AIA e outros compostos indólicos (Wang et al., 1982; Kaneshiro et al., 1983; Sekine et al., 1988). A produção de giberelinas não tem sido extensivamente estudada para esse grupo, existindo poucos relatos de produção desses compostos em meios de cultura (Atzorn et al., 1988). Por outro lado, vários rizóbios possuem também a capacidade de produzir diversos tipos de citoquininas (Sturtevant & Taller, 1989). Puppo e Rigaud acreditam que a presença tanto da planta hospedeira, quanto da bactéria, seja necessária para que haja a síntese de citoquininas, sendo tal síntese uma consequência direta da simbiose. Tais autores não identificaram citoquininas em culturas hidropônicas sem a presença do parceiro simbiótico (Puppo & Rigaud, 1978). Do mesmo modo, Sturtevant e Taller observaram que *B. japonicum*, quando em simbiose, tem sua habilidade de produção de citoquininas alterada quantitativa e qualitativamente (Sturtevant & Taller, 1988).

Não está muito claro, ainda, o papel dos fitohormônios produzidos pelos rizóbios, mas infere-se que tais substâncias possam estar envolvidas nos processos de formação de nódulos na planta hospedeira. Prinsen e colaboradores demonstraram que os flavonoides indutores de simbiose também estimulam a produção de AIA, sugerindo que a morfogênese nodular pode ser controlada por sinais altamente específicos em combinação com fitohormônios liberados pelos rizóbios (Prinsen et al., 1991). É possível que mudanças no balanço hormonal sejam necessárias para iniciar a formação dos nódulos (Long & Cooper, 1988), e que a expressão dos genes *nod* afete o balanço dos fitohormônios (Schmidt et al., 1991). Além disso, diversos estudos comprovaram que os níveis de AIA, giberelinas, ABA e citoquininas são muito superiores dentro dos nódulos já formados do que nas raízes da planta hospedeira (Bhowmick & Basu, 1984; Bhattacharyya & Basu, 1991; Roy & Basu, 1991). Milic e colaboradores observaram que estirpes mutantes de *B. japonicum* com capacidade de produção de AIA oito vezes superior a estirpes selvagens, quando inoculadas em soja, produziram plantas com maior biomassa e maior conteúdo de N nos tecidos, assim como maior atividade do complexo da nitrogenase (Milic et al., 1993).

Evidências sugerem que as citoquininas também apresentam papel importante no processo nodulatório, no seu desenvolvimento e funcionamento. Já foi descrito que as citoquininas induzem padrões de divisão celular semelhantes aos produzidos por fatores Nod, sugerindo que essas moléculas devem compartilhar elementos de suas vias de transdução de sinais para o córtex radicular (Bauer et al., 1996). A produção dos fitohormônios etileno e ABA por rizóbios é ainda controversa. Infere-se que a quantidade superior de tais substâncias dentro de nódulos já formados seja, em sua maioria, proveniente da planta hospedeira (Dangar & Basu, 1987; Hunter, 1992). Apesar disso, o etileno parece ser importante no processo de formação nodular (Stokkermans et al., 1992), visto que a aplicação exógena de tal composto aumenta a nodulação (Lee & LaRue, 1992). Já a quantidade de ABA dentro dos nódulos, contrariamente aos demais fitohormônios, aumenta conforme a idade destes, visto que tal substância é conhecidamente responsável pelos processos de senescência de tecidos (Bhattacharyya & Basu, 1991).

Além da simbiose efetiva de rizóbios com suas leguminosas hospedeiras, há muitos relatos da interação destes microrganismos com plantas não leguminosas, como arroz marrom africano (*Oriza glaberrima*) (Chaintreuil et al,

2000), algodão, milho (McInroy & Kloepper, 1995), trigo (Biederbeck et al., 2000) e canola (*Brassica napus*) (Lupwayi et al., 2000). Tais interações seriam benéficas para as plantas, principalmente, em função da produção de fitohormônios pelos rizóbios (Hayat et al., 2010).

Grande quantidade de estudos mostram que os fitohormônios de origem microbiana possuem um grande valor ecológico e um papel significativo para a indústria agrônômica. A liberação de tais substâncias por microrganismos, além de ter valor econômico, também fornece um aporte contínuo que, em muitos casos, mostra benefícios superiores quando comparado à aplicação de fitohormônios sintéticos (Arshad & Frankenberger, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros de nodulação em soja e de crescimento e produção de grãos em soja e milho, frente à adição de moléculas oriundas do metabolismo secundário de bactérias diazotróficas, em adição a inoculantes microbianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito de metabólitos secundários de bactérias diazotróficas, em adição a inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum*, na nodulação da soja;
- Analisar o efeito de metabólitos secundários de bactérias diazotróficas, em adição a inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum*, na produção de biomassa vegetal, conteúdo de N nos tecidos e rendimento de grãos de soja;
- Analisar o efeito de metabólitos secundários de bactérias diazotróficas, em adição a inoculantes com *Azospirillum brasilense*, na produção de biomassa vegetal, no conteúdo de N nos tecidos e no rendimento de grãos de milho;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ENSAIOS A CAMPO

4.1.2 Delineamento Experimental

Foram conduzidos cinco ensaios, entre dezembro de 2011 e fevereiro de 2012, sendo três deles com milho (híbrido BRASKALB - DKB-350-YG) e dois com soja (cultivar BMX POTÊNCIA RR). Os ensaios foram realizados em três diferentes regiões: na estação experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Ponta Grossa/PR (milho e soja), e em duas áreas particulares, situadas em Bonito/MS (milho e soja) e Três Lagoas/MS (milho). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com seis repetições por tratamento. No plantio de soja, cada parcela foi composta por oito linhas com espaçamento de 0,5m entre as fileiras e 6m de comprimento cada uma, totalizando 24 m². No plantio de milho, cada parcela foi composta por seis linhas, espaçadas em 0,8m entre as fileiras e 6m de comprimento, totalizando 28,8m². As coletas de material vegetal foram feitas aos 30 dias após a emergência das plantas e na época de colheita dos grãos, para verificação da produtividade. Nos plantios de soja, houve, ainda, uma coleta intermediária, quando as plantas atingiram o estágio R5 de desenvolvimento.

4.1.3 Análise e Preparo dos Substratos Utilizados

A análise química, granulométrica e da população microbiana naturalizada coletada na camada 0-20 cm dos solos onde os experimentos de campo foram instalados encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado da análise química, granulométrica e da população microbiana nativa (0-20 cm) dos solos das áreas experimentais, antes da instalação dos experimentos.

Local	Químicas								Granulometria			NMP	
	pH	P	H+Al	Al	K	Ca+Mg	SB	CTC	V	argila	silte	areia	rizóbios/g solo
	CaCl ₂	mg/dm ³	cmol _c /dm ³						%	g kg ⁻¹			
Bonito	4,22	1,94	8,42	1,02	0,45	3,98	4,43	12,85	34	162	266	572	< 10
Três	5,23	7,04	2,95	0,00	0,08	1,93	2,01	4,95	40	86	44	870	- ¹
Lagoas													
Ponta	5,68	2,55	3,63	0,00	0,11	4,55	4,66	8,29	56	238	30	732	9,324 x 10 ²
Grossa													

CTC = Capacidade de Troca de Cátions (H+Al + Ca + Mg + K); SB = soma de bases (Ca + Mg + K); Saturação por Bases (SB/CTC) x 100; NMP = Método do Número mais Provável (Vincent, 1970). ¹Dados não coletados.

4.1.4 Tratamento das Sementes e Semeadura

Foram utilizados inoculantes comerciais líquidos, com registro no MAPA. Antes da semeadura, todos os inoculantes utilizados passaram por controle de qualidade, através do método descrito na Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2012).

A garantia de concentração e pureza, assim como a espécie bacteriana das estirpes, e o resultado das análises de controle de qualidade dos inoculantes utilizados podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios a campo.

Cultura	Espécie bacteriana	Estirpes	Garantia (UFC*/mL)	Resultado controle de qualidade
Soja	<i>Bradyrhizobium</i>	SEMIA 5079,	5 x 10 ⁹	1,17 x 10 ¹⁰ UFC/mL
	<i>japonicum</i>	SEMIA 5080		Sem contaminação
Milho	<i>Azospirillum</i>	AbV5, AbV6	2 x 10 ⁸	2,47 x 10 ⁸ UFC/mL
	<i>brasiliense</i>			Sem contaminação

*UFC: Unidade formadora de colônia.

Metabólitos secundários concentrados (MSC) foram produzidos com as estirpes CIAT 899 de *R. tropici* e USDA 110 de *B. japonicum*. O processo de produção desses metabólitos está em processo de registro. Para o uso, os metabólitos liofilizados foram diluídos em solução acetonitrila-água 20% à concentração de, aproximadamente, 10⁻⁹ M a 10⁻⁸ M e adicionados, em diferentes quantidades, aos inoculantes, 48 horas antes da inoculação das sementes. As alíquotas de metabólitos adicionadas constituíram diferentes tratamentos, utilizados

nos ensaios. No caso dos ensaios com soja, os MSC provenientes de *B. japonicum* USDA 110 foram chamados homólogos, e os de *R. tropici* CIAT 899 foram denominados heterólogos. Nas plantas de soja, também foi feito um tratamento adicionando-se solução de genisteína 5,0µM (flavonoide indutor) ao inoculante.

A inoculação das sementes foi realizada utilizando-se 2 mL do produto para cada quilo de semente, para resultar em $1,2 \times 10^5$ células de *A. brasilense*/semente e $1,2 \times 10^6$ células de *B. japonicum*/semente.

O tratamento das sementes de soja e milho e suas semeaduras foram realizadas no mesmo dia em cada um dos ensaios. As três regiões de plantio possuem solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico. As datas de semeadura para cada local podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Locais e datas de semeadura das culturas da soja e do milho nos ensaios realizados a campo.

Cultura	Local	Data da semeadura
Soja	Bonito/MS (21°07' S e 56°28' O)	27/10/2011
	Ponta Grossa/PR (25°13' S e 50°1' O)	23/11/2011
Milho	Bonito/MS (21°07' S e 56°28' O)	28/10/2011
	Três Lagoas/MS (20°45' S e 51°41' O)	03/11/2011
	Ponta Grossa/PR (25°13' S e 50°1' O)	24/11/2011

Foram realizados sete diferentes tratamentos nas sementes de soja e seis tratamentos nas sementes de milho, momentos antes da semeadura, conforme pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4 - Tratamentos realizados em sementes de soja e milho para plantio a campo, na safra 2011/2012.

Cultura	Tratamentos
Soja	T1 - Testemunha não inoculada
	T2 – Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080)
	T3 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + genisteína
	T4 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + metabólitos secundários concentrados (MSC) de USDA 110 (1 mL/litro)
	T5 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (0,1 mL/litro)
	T6 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)
	T7 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)
Milho	T1 – 0%N + P + K
	T2 – 100%N + P + K
	T3 – 75% N + P + K
	T4 - 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)
	T5 – 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)
	T6 – 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)

4.1.5 Procedimentos de Amostragem

Trinta dias após a emergência, seis plantas de milho de cada repetição tiveram suas partes aéreas coletadas e armazenadas em sacos de papel, levados à estufa a 60°C até atingir massa constante, cerca de 72 h, para determinação da massa seca (massa da parte aérea seca, MPAS).

Plantas de soja de cada parcela foram coletadas no estágio R5 de desenvolvimento, conforme a escala de Fehr & Caviness (Fehr & Caviness, 1977). A parte aérea de cada amostra foi coletada e armazenada em sacos de papel, levados à estufa a 60°C até atingir massa constante, para determinação da massa seca. Os nódulos das raízes das plantas coletadas foram também destacados, lavados e colocados em estufa a 60°C para secagem. Após este período, os nódulos foram contados (número de nódulos, NN) e pesados (massa de nódulos secos, MNS).

A colheita dos grãos foi feita em diferentes datas, conforme a região de plantio (Tabela 5), e a determinação da produção de grãos foi feita em kg/ha, (corrigida para 13% de umidade).

Tabela 5 - Locais e datas de colheita da cultura da soja e de milho nos ensaios realizados a campo.

Cultura	Local	Data da colheita
Soja	Bonito/MS	20/03/2012
	Ponta Grossa/PR	03/04/2012
Milho	Bonito/MS	20/03/2012
	Três Lagoas/MS	29/02/2012
	Ponta Grossa/PR	30/05/2012

4.2 ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

4.2.1 Delineamento Experimental

Os ensaios em casa de vegetação foram conduzidos, durante 45 dias cada um, na sede da Embrapa Soja, em Londrina/PR. Três ensaios foram conduzidos concomitantemente, com plantios de soja (cultivar BRS 245) – em vasos de Leonard - e milho (variedade não comercial 256) – em vasos de Leonard e em vasos com solo (ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 1). Nos dois últimos ensaios, também concomitantes, foram cultivados soja (cultivar BRS 294 RR) e milho (variedade não comercial 256), em vasos com solo (ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento nos primeiros ensaios e cinco repetições por tratamento nos dois últimos ensaios.

4.2.2 Ensaio em Casa de Vegetação 1

4.2.2.1 Análise e preparo dos substratos utilizados

- **Vasos com solo**

Foi utilizado, como substrato, um Latossolo Vermelho Distrófico, coletado na camada 0-20 cm, proveniente de Ponta Grossa/PR, acondicionado em vasos de PVC, com capacidade para 4 kg. As análises químicas e granulométricas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características químicas e granulométricas do solo empregado nos ensaios de casa de vegetação 1.

pH	P	H + Al	Al	Ca	Mg	K	SB	CTC	V	m	C	MO	areia	silt e	argila
	mg/dm ³	-----cmolc/dm ³ -----									%		-----g kg ⁻¹ -----		

4,7	2,14	5,6	0,0	4,0	0,64	0,3	4,9	10,5	47,0	0,09	1,93	3,32	238	30	732

pH (CaCl₂); P (Melich I); H+Al (SMP); Al, Ca, Mg, K (KCl).

A correção do pH do solo para valores entre 5,5 e 6,0 foi realizada, utilizando-se aproximadamente 2 kg de calcário dolomítico previamente seco em estufa, a 105°C, por 24 horas, e peneirado, na quantidade aproximada de 0,01 g de calcário por vaso.

A análise química do solo serviu de parâmetro para a determinação das quantidades de macronutrientes (magnésio, fósforo e potássio) e micronutrientes (cobalto, molibdênio e ácido bórico) a serem adicionados para a correção da fertilidade dos solos nos vasos. Para correção de magnésio, foi feita uma solução utilizando 230 g de MgSO₄ diluídos em 5 litros de água destilada, com a distribuição de 25 mL da solução por vaso. A correção de fósforo e potássio foi feita utilizando-se 30 litros de uma solução contendo 60 g de K₂HPO₄, na quantidade de 150 mL por vaso. Por fim, a correção de micronutrientes foi feita pela adição de 5 litros de uma solução contendo 0,0057 g de CoSO₄.7H₂O, 0,0217 g de Na₂MoO₄.2H₂O e 2 g de ácido bórico, com a distribuição de 25 mL por vaso.

Para manutenção da umidade do solo em níveis desejados, foi determinada sua capacidade de campo (CC). Três amostras de 10 g de solo

encharcado e uma amostra de 10 g de solo seco foram colocadas em estufa a 105°C, por 24 h. Após o período de secagem as amostras foram pesadas novamente. A diferença entre o peso da amostra de solo úmido e o peso da amostra de solo seco, dividido pelo peso da amostra de solo seco e multiplicado por 100, resulta no valor, em porcentagem, da quantidade de água contida na mistura solo + água, que deixa o solo 100% encharcado (capacidade de retenção máxima de água). A partir desses valores, foi possível calcular 70% da capacidade de campo do solo e a quantidade de água a ser colocada nos vasos. Nesse ensaio, em cada vaso foi adicionado 1,25 L de água.

- **Vasos de Leonard**

Vasos de Leonard (Vincent, 1970) foram montados, contendo em sua porção superior uma mistura de areia e carvão moído (50% de cada), e solução nutritiva para vasos de Leonard isenta de nitrogênio para plantas (Broughton & Dilworth, 1971) em sua porção inferior. Os vasos montados foram, então, colocados em autoclave e esterilizados durante 2 h, a 121°C.

4.2.2.2 Tratamento das sementes e semeadura

Foram utilizados inoculantes líquidos comerciais, registrados no MAPA, na mesma quantidade descrita para os ensaios a campo. A garantia de concentração e pureza, assim como a espécie bacteriana das estirpes, e o resultado das análises de controle de qualidade dos inoculantes foi realizada utilizando a mesma metodologia utilizada nos ensaios a campo, e podem ser visualizados na Tabela 7. Os MSCs empregados nesses ensaios foram produzidos da mesma forma descrita para os ensaios a campo.

Tabela 7 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios em casa de vegetação 1.

Soja	<i>Bradyrhizobium</i>	SEMIA 5079,	5 x 10 ⁹	1,19 x 10 ¹⁰ UFC/mL
	<i>japonicum</i>	SEMIA 5080		Sem contaminação
Milho	<i>Azospirillum</i>	AbV5, AbV6	2 x 10 ⁸	2,67 x 10 ⁷ UFC/mL
	<i>brasiliense</i>			Sem contaminação

UFC: Unidade formadora de colônia.

Foram realizados sete tratamentos nas sementes de soja e seis tratamentos nas sementes de milho, tanto nos vasos de Leonard, quanto nos vasos com solo (Tabela 8). As sementes, antes da inoculação, foram previamente desinfestadas, conforme descrito por Hungria e Araujo (Hungria & Araujo, 1994). A inoculação das sementes foi realizada momentos antes da semeadura.

Foram plantadas cinco sementes por vaso e, aos sete dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso, exceto nos vasos de Leonard com milho, onde foi deixada apenas uma planta, em função do espaço limitado para o crescimento.

Imediatamente após o plantio, os vasos com sementes de milho receberam solução inicial de N, equivalente a 24 kg de N/ha (Vitti & Barros Júnior, 2001). A solução foi feita diluindo-se 7 g de nitrato de potássio (KNO₃) por litro de água destilada. Cinquenta mL da solução foram adicionados em cada vaso, totalizando 48 mg N/vaso.

Tabela 8 - Tratamentos realizados em sementes de soja (Vasos de Leonard) e milho (Vasos de Leonard e vasos com solo) para plantio em casa de vegetação.

Cultura	Tratamentos
Soja	T1 - Testemunha não inoculada
	T2 – Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080)
	T3 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + genisteína
	T4 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + Metabólitos Secundários Concentrados (MSC) de USDA 110 (1 mL/litro)
	T5 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (0,1 mL/litro)
	T6 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)
	T7 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)
Milho	T1 - Testemunha não inoculada
	T2 – Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)
	T3 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)
	T4 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)
	T5 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (1 mL/litro)
	T6 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (0,1 mL/litro)

4.2.3 Ensaio em Casa de Vegetação 2

4.2.3.1 Análise e Preparo dos Substratos Utilizados

Foi utilizado, como substrato, Latossolo Vermelho Distrófico, coletado na camada 0-20 cm, proveniente de Ponta Grossa/PR, acondicionado em vasos de PVC com capacidade para 4 kg. Os resultados das análises químicas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Características químicas do solo empregado nos ensaios de casa de vegetação 2.

pH	P	H + Al	Al	Ca	Mg	K	CTC	V
	mg/dm ³	-----cmolc/dm ³ -----						%
4,8	3,37	5,7	0,1	2,4	1,03	0,2	9,37	39,4
2			2	1		5		

pH (CaCl₂); P (Melich I); H+Al (SMP); Al, Ca, Mg, K (KCl).

Para a correção do pH do solo para valores entre 5,5 e 6,0, foram utilizados aproximadamente 4 kg de calcário calcítico, previamente seco em estufa, a 105°C, por 24 horas, e peneirado, na quantidade aproximada de 0,02 g de calcário por vaso.

A análise química do solo serviu de parâmetro para a determinação das quantidades de fósforo e micronutrientes (cobalto, molibdênio e ácido bórico) a serem adicionados para a correção da fertilidade dos solos nos vasos. A correção de fósforo para a cultura do milho foi feita utilizando-se 4 litros de uma solução contendo 46,05 g de K₂HPO₄, na quantidade de 50 mL por vaso; e para a cultura da soja, foram utilizados 2,25 litros de uma solução contendo 10,36 g de K₂HPO₄, na quantidade de 50 mL por vaso. Para a correção de micronutrientes, foram aplicados 5 litros de uma solução contendo 0,0049 g de CoSO₄.7H₂O, 0,0171 g de Na₂MoO₄.2H₂O e 1,7 g de ácido bórico, com a distribuição de 25 mL por vaso.

A capacidade de campo do solo foi calculada, como descrito para os ensaios anteriores. Para que o solo tivesse o equivalente a 70% de sua CC, foram adicionados 800 mL de água por vaso.

4.2.3.2 Tratamento das sementes e semeadura

Foram utilizados inoculantes líquidos comerciais, registrados no MAPA, na mesma quantidade descrita para os ensaios a campo. A garantia de concentração e pureza, assim como a espécie bacteriana das estirpes, e o resultado das análises de controle de qualidade dos inoculantes foi realizada utilizando a mesma metodologia utilizada nos ensaios a campo, e podem ser visualizados na Tabela 10. Os MSCs empregados nesses ensaios foram produzidos da mesma forma descrita para os ensaios a campo. Porém, em função das respostas pouco visíveis à adição de MSCs, especialmente em soja nos ensaios anteriores, foram utilizadas maiores quantidades destes compostos.

Foram conduzidos seis tratamentos nas sementes de soja e milho (Tabela 11). A preparação das sementes e a inoculação foram feitas conforme descrito para os ensaios em casa de vegetação 1.

Tabela 10 - Características dos produtos inoculantes e resultado das análises de controle de qualidade dos produtos inoculantes utilizados nos ensaios em casa de vegetação 2.

Soja	<i>Bradyrhizobium</i>	SEMIA 5079,	5 x 10 ⁹	1,36 x 10 ¹⁰ UFC/mL
	<i>japonicum</i>	SEMIA 5080		Sem contaminação
Milho	<i>Azospirillum</i>	AbV5, AbV6	2 x 10 ⁸	1,86 x 10 ⁸ UFC/mL
	<i>brasiliense</i>			Sem contaminação

*UFC: Unidade formadora de colônia.

Tabela 11 - Tratamentos realizados em sementes de soja e milho em ensaios de casa de vegetação (vasos com solo).

Cultura	Tratamentos
Soja	T1 - Testemunha não inoculada
	T2 – Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080)
	T3 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + Metabólitos Secundários Concentrados (MSC) de CIAT 899 (1,25 mL/litro)
	T4 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,25 mL/litro)
	T5 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (5 mL/litro)
	T6 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (1 mL/litro)
Milho	T1 - Testemunha não inoculada

T2 – Inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)

T3 - Inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (1,25 mL/litro)

T4 - Inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (0,25 mL/litro)

T5 - Inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (5 mL/litro)

T6 - Inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (1 mL/litro)

Foram semeadas cinco sementes por vaso e, aos sete dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Imediatamente após o plantio, os vasos com sementes de milho receberam solução de N, equivalente a 24 kg N/ha, como descrito para os ensaios em casa de vegetação 1.

4.2.4 Condução dos Experimentos

Os vasos com solo, em ambos os ensaios, foram regados periodicamente, para não haver restrição hídrica. Nos ensaios de casa de vegetação 1, os vasos de Leonard receberam solução nutritiva isenta de N, autoclavada, de dois em dois dias, ou quando houvesse necessidade.

4.2.5 Procedimentos de Amostragem

A desinstalação dos experimentos foi feita 45 dias após o plantio. A parte aérea (PA) foi coletada e armazenada em sacos de papel, levados à estufa a 60°C até atingir massa constante, para determinação da massa seca (MSPA). Os vasos foram, então, desmontados cuidadosamente, as raízes foram lavadas e acondicionadas em sacos de papel, também levados à estufa a 60°C para a determinação da massa seca (massa de raízes secas, MRS).

Após a pesagem das raízes, os nódulos das plantas de soja foram coletados, contados (NN) e pesados (MSN).

4.3 TEOR DE NITROGÊNIO DA PARTE AÉREA

Para a determinação do teor de N na parte aérea das plantas coletadas nos experimentos, as mesmas foram moídas, e 0,1 g do tecido moído de cada amostra foi submetido à digestão sulfúrica. A quantificação de N foi realizada em espectrofotômetro pelo método de verde de salicilato (Searle, 1984). Os resultados obtidos pela leitura em espectrofotômetro propiciaram a determinação do teor de nitrogênio em mgN/g de planta (N). Este resultado foi, então, multiplicado pela massa seca da parte aérea de cada planta, obtendo-se, o conteúdo de N em cada planta, expresso em mgN/planta (NTPA).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância, com aplicação do teste F. Nos ensaios a campo, constatada a significância estatística, os dados foram submetidos ao teste de Duncan a 5% e, também, a 10% de probabilidade, neste último caso, conforme especificado na Instrução Normativa do MAPA, Anexo IN nº 13 (MAPA, 2011). Já nos ensaios em casa de vegetação, os dados foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS A CAMPO

5.1.1 Milho

Em Bonito/MS, as plantas cultivadas sob o Tratamento 6 (75% N + Inoculação com *A. brasilense* + 0,1 mL/L de MSC de CIAT 899) obtiveram os maiores valores de teor de N na parte aérea em comparação aos demais tratamentos, exceto quando comparado ao Tratamento 5 (75% N + Inoculação com *A. brasilense* + 1 mL/L de MSC de CIAT 899). Em relação à produção de grãos, o Tratamento 6 foi também superior aos Tratamentos 1 (0% N + P + K) e 3 (75% N + P + K) (Tabela 12).

Em Ponta Grossa/PR, o Tratamento 6 também se destacou, obtendo os maiores valores de massa seca da parte aérea em comparação aos Tratamentos 1 e 4 (75% N + Inoculação com *A. brasilense*); o maior teor de N na parte aérea quando comparado com os Tratamentos 1, 4 e 5; maior acúmulo de N na parte aérea quando confrontado com os Tratamentos 1, 3 e 4; e maior produção de grãos do que os Tratamentos 1 e 4.

Em Três Lagoas/MS, o Tratamento 2 (100% N + P + K) se destacou, obtendo os maiores valores de massa seca da parte aérea quando comparado aos Tratamentos 1, 4, 5 e 6; maior teor de N na parte aérea em comparação aos Tratamentos 1 e 5; e maior acúmulo de N na parte aérea quando confrontado com os Tratamentos 1, 4, 5 e 6. Já em relação à produção de grãos, os Tratamentos 6 e 4 obtiveram valores maiores do que o Tratamento 1.

Fazendo um contraponto em relação ao rendimento de grãos, em valores percentuais, em Bonito/MS, as plantas sob o Tratamento 6 produziram 20% a mais de grãos em comparação ao Tratamento 1 (0%N + P + K), 17% a mais em comparação ao Tratamento 4 (75% N + Inoculação com *A. brasilense*) e 6% a mais em comparação ao Tratamento 2 (100% N + P + K).

Em Ponta Grossa/PR, apesar do Tratamento 2 ter apresentado os maiores valores absolutos de produção, novamente o Tratamento 6 resultou em 42% a mais de grãos por hectare quando comparado ao Tratamento 1, e 12% a mais quando comparado ao Tratamento 4.

O mesmo padrão foi observado no plantio realizado em Três Lagoas/MS, com o Tratamento 6 apresentando valores de produção 36% maiores do que o Tratamento 1, e 12% maiores do que o Tratamento 2.

5.1.2 Soja

Os resultados das análises estatísticas, por região de plantio, podem ser visualizados na Tabela 13. Os valores observados não demonstraram clara superioridade dos tratamentos com MSCs nas variáveis analisadas ($p < 0,10$).

Em Ponta Grossa/PR, o Tratamento 5 (Inoculação + 0,1 mL/L de MSC de USDA 110), obteve os maiores valores de número de nódulos quando comparado aos Tratamentos 2 (Inoculação com *B. japonicum*) e 6 (Inoculação com *B. japonicum* + 1mL/litro de MSC de CIAT 899); e os maiores valores de massa de nódulos secos em comparação com os Tratamentos 1 (Testemunha não inoculada), 2, e 7 (Inoculação com *B. japonicum* + 0,1mL/litro de MSC de CIAT 899). Analisando os valores absolutos de produção de grãos, o Tratamento 4 (inoculação + 1 mL/L de MSC de USDA 110), apresentou valores 6% superiores ao Tratamento 1 e 5,3% superiores ao Tratamento 2.

Em Bonito/MS, quando observada a produção de soja em valores absolutos, o Tratamento 5 obteve valores 7,5% superiores aos Tratamentos 1 e 2.

Tabela 12 - Efeito da inoculação com *Azospirillum* e diferentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS), produção de grãos (kg/ha, PROD), e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em campo, no período de dezembro/fevereiro de 2012.

Tratamento	Bonito/MS				Ponta Grossa/PR				Três Lagoas/MS			
	MPAS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)	PROD (kg/ha)	MPAS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)	PROD (kg/ha)	MPAS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)	PROD (kg/ha)
T1 – 0%N + P + K	13,1 ¹ a	30,72 de	402 a	5452 b	17,2 c	15,0 c	255 c	5708 c	7,1 c	22,4 c	160 b	2444 b
T2 – 100%N + P + K	16,1 a	31,66 cd	510 a	6184 ab	26,4 ab	21,4 ab	558 ab	8483 a	9,7 a	26,0 a	252 a	2965 ab
T3 – 75% N + P + K	12,4 a	32,78 bc	407 a	5516 b	24,2 ab	21,1 ab	511 b	7964 ab	9,4 ab	25,7 ab	243 a	3010 ab
T4 – 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)	14,0 a	29,28 e	412 a	5625 ab	22,1 bc	20,2 b	445 b	7208 b	7,9 bc	25,3 ab	200 b	3319 a
T5 – 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)	11,5 a	34,32 ab	399 a	6091 ab	25,5 ab	20,5 b	542 ab	7707 ab	7,0 c	24,7 b	172 b	2972 ab
T6 – 75% N + Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)	12,9 a	35,54 a	458 a	6561 a	29,5 a	22,8 a	669 a	8113 a	7,9 bc	25,3 ab	199 b	3322 a

¹ Médias (n=5) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Duncan).

Tabela 13 - Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium* e diferentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS), produtividade de grãos (kg/ha, PROD), e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em campo, no período de dezembro a fevereiro de 2012.

Tratamento	Bonito/MS						Ponta Grossa/PR					
	NN (n°/pl)	MNS (mg/pl)	MPAS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)	PROD (kg/ha)	NN (n°/pl)	MNS (mg/pl)	MPAS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)	PROD (kg/ha)
T1 – Testemunha não inoculada	10,4 ¹ ab	43 b	18,4 ab	20,2 a	371 b	2701 b	45,7 a	163 ab	10,4 ab	36,5 a	379 a	3166 a
T2 – Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080)	15,1 ab	68 a	13,3 ab	20,4 a	271 c	2703 b	42,0 a	149 b	10,4 ab	35,1 ab	365 a	3191 a
T3 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + genisteína	10,7 ab	44 b	14,4 ab	20,2 a	290 c	2737 ab	48,7 a	171 ab	12,3 a	32,0 b	393 a	3337 a
T4 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC USDA de 110 (1 mL/litro)	18,2 a	65 a	17,4 ab	17,6 a	306 c	2750 ab	52,5 a	206 a	12,1 a	34,6 ab	418 a	3359 a
T5 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC USDA 110 (0,1 mL/litro)	16,0 a	68 a	19,8 ab	17,6 a	348 b	2906 a	57,8 a	212 a	11,3 ab	34,6 ab	390 a	3275 a
T6 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)	7,3 b	25 c	10,4 b	16,8 a	174 d	2641 b	45,3 a	170 ab	9,2 ab	33,4 ab	307 a	3202 a
T7 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)	13,4 ab	70 a	23,4 a	18,1 a	423 a	2817 ab	46,8 a	162 ab	8,9 b	35,3 ab	314 a	3253 a

¹Médias (n=5) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Duncan).

5.2 ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 1

5.2.1 Milho

Os resultados das análises estatísticas de MPAS, MRS, DC, N e NT em vasos de Leonard e em vasos com solo podem ser visualizados na Tabela 14.

O experimento em vasos de Leonard demonstrou que o Tratamento 6 (inoculação + 0,1 mL/L de MSC de USDA 110) obteve os maiores valores absolutos em todos os parâmetros analisados, sendo esta superioridade estatisticamente significativa em N (mg/g) e NTPA (mg/planta).

No ensaio utilizando vasos com solo, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em todos os parâmetros analisados.

5.2.2 Soja

Os resultados das análises estatísticas de MPAS, MRS, NN, MNS, N e NT podem ser visualizados na Tabela 15. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, é possível notar que o Tratamento 4 (inoculação + 1 mL/L de MSC de USDA 110) obteve os maiores valores absolutos para as características analisadas, exceto em N.

Tabela 14 - Efeito da inoculação com *Azospirillum* e difentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS, massa da raiz seca, MRS e diâmetro do caule no 2° nó, DC), e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em Vasos de Leonard e vasos com solo em casa de vegetação, no período de janeiro/fevereiro de 2012.

Tratamento	Vasos de Leonard					Vasos com solo				
	MPAS	MRS	DC	N	NT	MPAS	MRS	DC	N	NT
	(g/pl)	(g/pl)	(cm/pl)	(mg/g)	(mg/pl)	(g/pl)	(g/pl)	(cm/pl)	(mg/g)	(mg/pl)
T1 - Testemunha não inoculada	0,7 a	1,0 ab	7,0 a	5,3 b	3,4 b	5,7 a	6,0 a	11,3 a	16,7 a	97 a
T2 – Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6)	0,8 a	1,1 ab	7,3 a	5,1 b	3,8 b	5,2 a	5,2 a	10,8 a	12,8 a	65 a
T3 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (1mL/litro)	0,7 a	1,1 ab	7,4 a	4,9 b	3,5 b	5,3 a	5,2 a	10,3 a	13,5 a	69 a
T4 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de CIAT 899 (0,1mL/litro)	0,6 a	0,8 b	6,6 a	5,2 b	3,3 b	5,3 a	5,5 a	10,5 a	13,1 a	70 a
T5 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (1mL/litro)	0,7 a	0,9 ab	7,4 a	5,2 b	3,6 b	5,1 a	3,9 a	10,5 a	12,1 a	60 a
T6 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) + MSC de USDA 110 (0,1mL/litro)	0,9 a	1,3 a	7,8 a	9,8 a	8,3 a	6,0 a	6,6 a	10,6 a	13,2 a	77 a

¹ Médias (n=6) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

Tabela 15 - Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium* e difentes concentrações de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS, e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em Vasos de Leonard, no período de janeiro/fevereiro de 2012.

Tratamento	Vasos de Leonard					
	NN (n°/pl)	MNS (mg/pl)	MPAS (g/pl)	MRS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)
T1 - Testemunha não inoculada	-	-	0,8 b	0,5 b	6,6 b	5 b
T2 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080)	38,0 ¹ b	162 a	1,3 a	0,8 a	19,4 a	26 a
T3 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + genisteína	45,2 a	169 a	1,3 a	0,7 a	21,3 a	28 a
T4 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (1 mL/litro)	45,8 a	180 a	1,4 a	0,8 a	21,6 a	29 a
T5 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (0,1 mL/litro)	42,5 a	140 a	1,2 ab	0,6 ab	19,1 a	24 a
T6 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (1 mL/litro)	33,2 b	138 a	1,2 ab	0,7 ab	20,7 a	25 a
T7 - Inoculação com <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 E SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,1 mL/litro)	32,5 b	128 a	1,1 ab	0,6 ab	19,8 a	23 a

¹Médias (n=6) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

5.3 ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO 2

5.3.1 Milho

Os resultados das análises estatísticas deste ensaio para os parâmetros analisados podem ser visualizados na Tabela 16. Neste ensaio, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Tabela 16 - Efeito da inoculação com *Azospirillum* e difentes quantidades de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS) e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em milho cultivado em vasos com solo em casa de vegetação, no período de junho/agosto de 2012.

Tratamento	Vasos com solo			
	MPAS (g/pl)	MRS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)
T1 - Testemunha não inoculada	3,9 a	3,0 a	11,1 a	21 a
T2 – Inoculação com <i>A. brasilense</i> , cepas Ab-V5 e Ab-V6	4,0 a	2,1 a	9,5 a	19 a
T3 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> , cepas Ab-V5 e Ab-V6 + MSC de CIAT 899 (1,25 mL/litro)	4,5 a	2,3 a	9,6 a	21 a
T4 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> , cepas Ab-V5 e Ab-V6 + MSC de CIAT 899 (0,25 mL/litro)	3,9 a	2,2 a	9,4 a	18 a
T5 - Inoculação com <i>A. brasilense</i> , cepas Ab-V5 e Ab-V6 + MSC de USDA 110 (5,0 mL/litro)	3,9 a	2,6 a	10,8 a	21 a
T6 – Inoculação com <i>A. brasilense</i> , cepas Ab-V5 e Ab-V6 + MSC de USDA 110 (1,0 mL/litro)	3,8 a	2,3 a	10,9 a	20 a

Médias (n=6) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

5.3.2 Soja

A análise estatística das variáveis analisadas está representada na Tabela 17. Neste ensaio, quanto às variáveis NN, MNS, MSPA e MSR, os maiores valores absolutos foram identificados no Tratamento 2 (inoculação). Quanto à quantidade de nitrogênio (N e NT), os maiores valores absolutos foram verificados no Tratamento 3 (inoculação + 1,25 mL/L de MSC de USDA 110), sendo os valores de N estatisticamente superiores aos Tratamentos 1 (Testemunha não inoculada) e 2.

Tabela 17 - Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium* e difentes quantidades de metabólitos secundários concentrados (MSC) de CIAT 899 e USDA 110 na nodulação (número de nódulos, NN; e massa de nódulos secos, MNS) no crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS; e massa da raiz seca, MRS) e N na parte aérea (teor [N] e acúmulo [NT]) em soja cultivada em vasos com solo em casa de vegetação, no período de junho/agosto de 2012.

Tratamento	Vasos com solo					
	NN (n°/pl)	MNS (mg/pl)	MPAS (g/pl)	MRS (g/pl)	N (mg/g)	NT (mg/pl)
T1 - Testemunha não inoculada	22,0 ¹ ab	50 a	1,8 ab	0,5 a	22,6 b	41 a
T2 - Inoculação com <i>B. Japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080)	30,5 a	57 a	1,9 a	0,5 a	23,2 b	44 a
T3 - Inoculação com <i>B. Japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (1,25 mL/litro)	20,0 b	29 b	1,6 ab	0,4 a	28,5 a	44 a
T4 - Inoculação com <i>B. Japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) + MSC de CIAT 899 (0,25 mL/litro)	19,2 b	29 b	1,3 b	0,3 a	26,5 ab	36 a
T5 - Inoculação com <i>B. Japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (5,0 mL/litro)	20,5 b	39 ab	1,7 ab	0,4 a	25,6 ab	43 a
T6 - Inoculação <i>B. Japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) + MSC de USDA 110 (1,0 mL/litro)	20,6 b	38 ab	1,6 ab	0,4 a	25,0 ab	39 a

¹ Médias (n=5) da mesma coluna, seguidas por diferentes letras, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

A produção de metabólitos secundários é frequente em ambientes onde a competição por nutrientes e espaço é grande, como o solo, ou a água. A síntese de tais metabólitos evoluiu para que tais moléculas pudessem ser utilizadas como uma “arma” evolutiva, aumentando as chances de sobrevivência da espécie produtora (Demain, 1998).

Apesar de ainda serem pobremente estudadas, as rizobioicinas, antimicrobianos produzidos por rizóbios (Mourad et al., 2009), podem desempenhar um fator importante no incremento da nodulação da planta hospedeira, visto que são capazes de diminuir a população de possíveis microrganismos competidores na rizosfera.

Para outra classe de metabólitos secundários produzidos por rizóbios, os exopolissacarídeos (EPS), também foi demonstrado que possuem um papel crucial na sobrevivência destes microrganismos, visto que parecem atuar como protetores em casos de estresses abióticos, como períodos de seca, alterações osmóticas e de pH (Castellane & Lemos, 2007), aumentando sobremaneira sua sobrevivência. Além disso, estudos com diversas espécies de *Rhizobium* demonstraram que os EPS teriam um papel bastante importante na interação entre a leguminosa hospedeira e a bactéria, atuando na sinalização celular de ambos os organismos (Kirichenko et al., 2004; Becker et al., 2005). Exopolissacarídeos compostos por fibrilas de celulose parecem ser importantes para a formação de um biofilme de rizóbios, após a adesão destes aos pelos radiculares (Williams et al., 2008). Apesar de não serem necessárias à infecção da raiz ou ao aumento da competitividade na infecção, mutantes de *R. leguminosarum* deficientes na produção de fibrilas de celulose formaram menos nódulos, com diminuição dos níveis de infecção, e aglutinações no cordão de infecção (Laus et al., 2005). Desse modo, a adição de EPS a inoculantes pode, dentro de certos limites, aumentar a sobrevivência das bactérias e promover um aumento da infecção e nodulação e, conseqüentemente, da FBN.

Lipoquitooligossacarídeos (LCOs), ou fatores Nod, produzidos por rizóbios são conhecidos por afetar um grande número de processos fisiológicos na planta hospedeira, incluindo indução da deformação de pelos radiculares (Spaink, 1996), ontogenia de estruturas nodulares (Fisher & Long, 1992; Denarie & Cullimore,

1993), e estimulação de divisões celulares corticais (Sanjuan et al., 1992). Todas essas influências indicam que os LCOs são agentes mitogênicos e morfogênicos, possuindo efeito semelhante às citoquininas e aos inibidores de transporte de auxina (Relic et al., 1993). Além disso, essas moléculas ativam, no hospedeiro, a expressão de genes essenciais ao processo de nodulação (nodulinas) e à formação do cordão de infecção (Horvath et al., 1993; Minami et al., 1996), bem como ativam enzimas relacionadas à defesa das plantas (Inui et al., 1997).

No caso dos ensaios com soja em casa de vegetação, não houve uma resposta fisiológica e de nodulação clara em relação à adição de MSC aos tratamentos. Porém, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos no primeiro ensaio, em vasos de Leonard, o tratamento contendo 1 mL/L de MSC de USDA 110 (homólogo) resultou nos maiores valores absolutos de massa de nódulos secos (11% superior ao tratamento apenas inoculado – T2), massa da parte aérea seca (9% superior a T2), massa da raiz seca (9% superior a T2) e nitrogênio total (15% superior a T2). No mesmo ensaio, todos os parâmetros fisiológicos e de nodulação observados nas plantas pertencentes aos tratamentos onde foram adicionados MSC de CIAT 899 (heterólogo) em diferentes concentrações (1 mL/L e 0,1 mL/L), obtiveram valores absolutos inferiores ao tratamento somente inoculado (exceto em N). A falta de resposta fisiológica da planta nesses tratamentos talvez seja causada por especificidades. Por exemplo, tanto no caso de EPS, quanto no caso de LCOs produzidos por rizóbios, cada um tem sua estrutura básica modificada de maneira estirpe-específica, variando enormemente entre as espécies (Mabood et al., 2008). Os genes responsáveis por essas modificações em LCOs são conhecidos como “genes *nod* de especificidade hospedeira” (Mabood et al., 2008). No caso de *B. japonicum*, o gene *nodZ* é responsável por produzir um LCO que possui um grupo metil-fucose em sua extremidade redutora, sendo esse grupamento responsável pelo reconhecimento da planta hospedeira (soja) (López-Lara et al., 1996). Assim, é possível que, ao utilizar MSC de outra espécie de rizóbio (*R. tropici*), os tratamentos não tenham respondido de maneira satisfatória. Nesse mesmo ensaio, o tratamento que recebeu o flavonoide genisteína (5 µM) não apresentou resultados estatisticamente superiores aos do tratamento que recebeu MSC, que incluía, entre outros compostos, LCO homólogo (0,1 mL/L), exceto no número de nódulos. A genisteína é o principal flavonoide indutor da expressão de LCOs em *B. japonicum* (Kosslak et al., 1987). Leibovitch e colaboradores conduziram ensaios a campo no

Canadá e Estados Unidos, utilizando soja inoculada com produto comercial contendo genisteína, durante seis anos (Leibovitch et al., 2001). Os resultados desse estudo apontam que o sucesso dessa tecnologia é temperatura-dependente. As plantas reagiram positivamente ao produto (incrementos de 10% na produção) quando cultivadas em condições de solo frio, com temperaturas inferiores a 17,5°C (Leibovitch et al., 2001). O fato de que, no presente ensaio, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação em pleno verão (janeiro/fevereiro), pode ter contribuído para os resultados não satisfatórios das plantas que receberam solução de genisteína. Contudo, é possível, também, que seja uma questão de ajuste de dose.

Curiosamente, no segundo ensaio, realizado em vasos com solo, em casa de vegetação, porém com quantidades maiores de MSC (1,25 mL/L e 0,25 mL/L de MSC heterólogo e 5 mL/L e 1 mL/L de MSC homólogo), não houveram respostas fisiológicas satisfatórias em nenhum dos quatro tratamentos onde foram adicionados MSC, sendo os valores absolutos obtidos, inclusive, inferiores aos apresentados pelas plantas que receberam apenas inoculação. É sabido que LCOs são ativos em concentrações extremamente baixas. Concentrações na casa dos pico/nanomolares são capazes de induzir as mudanças fisiológicas na raiz da planta hospedeira (Mabood et al., 2008). Talvez o aumento substancial da quantidade de MSC, utilizado nos tratamentos do segundo ensaio, tenham, de alguma forma, diminuído a ação destes sobre a planta, ou até mesmo, inibido o desenvolvimento vegetal.

Assim como nos ensaios em casa de vegetação, os resultados dos ensaios a campo, em ambos os locais de plantio, não mostraram diferença estatisticamente significativa das plantas que receberam MSC no que diz respeito aos parâmetros de MPAS, NN e MNS. Porém, as diferenças, quando se trata de produtividade (kg/ha), foram expressivas. Em Bonito, o tratamento que recebeu 0,1mL/L de MSC homólogo resultou em 106 kg de grãos a mais do que o tratamento somente inoculado (aumento de 4%), e 205 kg a mais do que o tratamento testemunha (não inoculado) (aumento de 8%). Já em Ponta Grossa, o tratamento que apresentou os maiores valores absolutos de produção entre os tratamentos inoculados foi o das plantas que receberam 1 mL/L de MSC homólogo, produzindo 168 kg a mais do que o tratamento somente inoculado (aumento de 5%) e 193 kg a mais do que o tratamento testemunha (aumento de 6%). Apesar destes resultados

não serem estatisticamente significativos, em grande escala representam aumentos consideráveis de produção, em ambos os casos. Em um experimento a campo, realizado pela Fundação Rio Verde, utilizando um produto comercial contendo LCOs para aplicação foliar em soja, nos estágios V4 e V10, em diferentes cultivares, também não foram obtidos resultados estatisticamente significativos na produção de grãos, apesar de a aplicação do produto no estágio V4 ter propiciado um melhor arranque inicial das plantas em relação à testemunha (Fundação Rio Verde, 2012a).

Ao contrário dos resultados obtidos nos ensaios de soja, os dos ensaios com milho mostraram bastante influência da adição de MSC no crescimento vegetal e na produção de grãos. No primeiro ensaio realizado em vasos de Leonard, em casa de vegetação, o tratamento contendo 0,1 mL/L de MSC de USDA 110 resultou nos maiores valores absolutos em todos os parâmetros analisados, sendo as variáveis mgN/planta e nitrogênio total estatisticamente superiores às dos demais tratamentos. A mesma tendência ocorreu nos vasos com solo, exceto nas variáveis relacionadas à quantidade de nitrogênio na planta. Dentre as moléculas compondo os MSC, estão LCOs, e Souleimanov e colaboradores verificaram que, em condições de cultivo hidropônicas, plantas de milho tiveram incremento de até 11% em sua biomassa quando LCO de *B. japonicum*, em uma concentração de 10^{-7} M, foi adicionado à solução (Souleimanov et al., 2002). Já foi descrito anteriormente que, em plantas não hospedeiras, os LCOs parecem ter um papel importante, induzindo diversas respostas fisiológicas (Souleimanov et al., 2002). A aplicação de LCOs em culturas de plantas mimetiza a modificação no balanço citoquinina-auxina, observada quando da aplicação de citoquinina (Relic et al., 1993). O estudo de Relic demonstra que a aplicação de LCOs estimula a acumulação de biomassa e mudanças na morfologia e fisiologia da planta, suportando a hipótese de os LCOs serem moléculas que agem de maneira semelhante a fitohormônios (Relic et al., 1993). Os incrementos no crescimento vegetal do milho induzidos pela adição de MSC que incluem, entre outras moléculas, LCOs, demonstrados neste ensaio, podem ser causados pelos efeitos semelhantes a hormônios vegetais que esses compostos possuem.

Tais moléculas também já demonstraram ser ativadoras de divisões celulares (ativação dos genes do ciclo celular) e desenvolvimento embrionário de plantas não hospedeiras (Souleimanov et al., 2002). Estudos anteriores demonstraram uma rápida indução e alcalinização de células de tabaco (*Nicotiana*

sp.) (Baier et al., 1999) e tomate (Staehein et al., 1994) em culturas celulares expostas a LCOs. De Jong e colaboradores demonstraram que cenouras (*Daucus carota*) mutantes sensíveis ao calor tiveram seus processos de divisão celular e desenvolvimento embrionário restaurados após exposição a LCOs (De Jong et al., 1993). Do mesmo modo, culturas de células embrionárias de abeto da Noruega (*Picea abies*) tiveram sua divisão celular reiniciada quando LCOs foram adicionados ao meio, mesmo em ausência de auxina e citoquinina (Dyachok et al., 2000). Apesar de não serem os organismos alvo dos LCOs, já foram isolados genes responsivos a LCOs (*enod12* e *enod40*) em arroz (não leguminosa), sugerindo que a percepção de LCOs pode ser conservada em uma ampla variedade de plantas (Kouchi et al., 1999; Reddy et al., 1998).

No segundo ensaio em casa de vegetação, não houve forte evidência do benefício da adição de MSC em nenhum dos parâmetros fisiológicos analisados. Da mesma maneira que o ocorrido com as plantas de soja, pode-se supor que o aumento significativo das quantidades de MSC adicionadas às plantas pode não ter sido benéfico para o crescimento vegetal.

No ensaio conduzido a campo, o tratamento contendo 0,1 mL/L de MSC de CIAT 899 foi superior aos demais em alguns dos parâmetros analisados, nas três regiões analisadas, principalmente aqueles onde as diferenças de produção chegam a ultrapassar os 1000 kg. Yanni e colaboradores demonstraram que a associação entre plantas de arroz e LCOs produzidos por *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii pode aumentar a produção de grãos de algumas cultivares em condições de campo (Yanni et al., 1997). Do mesmo modo, em ensaio da Fundação Rio Verde conduzido a campo com milho, foi demonstrado que a aplicação de LCOs nas sementes propiciou um aumento de 7,5% na produção, em relação ao tratamento com inoculação padrão, o que equivale a 532,7 kg.ha⁻¹ de retorno pela aplicação da tecnologia (Fundação Rio Verde, 2012b). Apesar dos mecanismos de atividade semelhantes a fitohormônios dos LCOs não estarem completamente elucidados, a aplicação externa de LCOs deve, de alguma maneira, modificar o controle e balanço dos fitohormônios (como auxina-citoquinina), provocando grandes mudanças no crescimento e desenvolvimento vegetal (Soleimanov et al., 2002). Esse pode ser o caso também observado em nosso estudo, com a adição de MSC às plantas de milho.

O entendimento da sinalização molecular que ocorre entre microrganismos diazotróficos e plantas tem crescido nos últimos anos, com o advento de tecnologias mais acuradas. Porém, pesquisas recentes revelam que essa sinalização é mais complexa do que o imaginado anteriormente, e que tem um papel no aumento do crescimento vegetal, através de uma ampla gama de mecanismos e culturas vegetais (Mabood et al., 2006). Tudo isso indica a importância do estudo desses processos, para posterior aplicação na produção de inoculantes mais eficazes no aumento da fixação biológica do nitrogênio e de promoção do crescimento vegetal, com impactos na produção de alimentos.

A aplicação de moléculas do metabolismo secundário de bactérias, como os LCOs, em inoculantes comerciais para promoção da nodulação e crescimento vegetal é uma tecnologia relativamente recente (Mabood et al., 2008). Como exemplo, foi lançado um produto contendo células de *B. japonicum* e moléculas de LCO, para utilização na cultura de soja, já comercializado em diversos países (Smith, 2005). No mesmo ano, foi anunciado o lançamento de um novo produto baseado na tecnologia dos LCOs, capaz de estimular o crescimento em uma ampla variedade de plantas não leguminosas (McIver, 2005).

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam a importância e a necessidade de mais estudos acerca da interação das moléculas provenientes do metabolismo secundário microbiano na sinalização bactéria-planta hospedeira, a fim de comprovar sua eficácia no aumento da nodulação, fixação biológica do nitrogênio e produtividade de culturas de interesse agrônômico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de moléculas provenientes do metabolismo secundário de rizóbios a plantas de milho mostrou-se eficiente no acréscimo de biomassa vegetal e na produção de grãos, nos experimentos de casa de vegetação e a campo.

- A campo, foi verificado um aumento considerável da produção de grãos no tratamento que recebeu 0,1 mL/L de metabólitos secundários concentrados provenientes da estirpe CIAT 899.
- Nos ensaios em casa de vegetação, o maior incremento de biomassa vegetal se deu nas plantas que receberam 0,1 mL/L de metabólitos secundários concentrados provenientes da estirpe USDA 110.
- Quando a concentração de metabólitos secundários concentrados foi aumentada, não houve incrementos significativos na biomassa vegetal do milho em casa de vegetação.

A adição de MSCs a plantas de soja não demonstrou incrementos significativos ($p < 0,10$) na biomassa vegetal e na produção de grãos, tanto nos ensaios de casa de vegetação, quanto nos ensaios a campo. Por isso, mais estudos tem de ser direcionados, a fim de comprovar a eficácia da adição dessas moléculas a inoculantes, principalmente para a soja, com o objetivo de incrementos na biomassa vegetal e, conseqüentemente, na produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABIOVE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **Quadros – exportações do complexo soja – 1992 a 2013**. Disponível em: http://www.abiove.com.br/exporta_br.html. Acesso em: 27 outubro 2012.
- ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. **Vendas de inoculantes das empresas filiadas à ANPII**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/?estatistica/2/>. Acesso em: 11 novembro 2012.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbial production of plant growth regulators. In: METTING, B. F. (Ed.). **Soil microbial ecology**. Marcel Dekker, New York, p. 307-347, 1993.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v. 62, p. 45-151, 1998.
- ATZORN, R. et al. Production of giberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. **Planta**, v. 175, p. 532-538, 1988.
- BAIER, R. et al. Alfafa and tobacco cells react differentially to chitin oligo-saccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors. **Planta**, v. 210, p. 157-164, 1999.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 924-929, 1983.
- BAR, T.; OKON, Y. Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Symbiosis**, v. 13, p. 191-198, 1992.
- BARASSI, C. A. et al. Potencialidad de *Azospirillum* em optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Eds.). **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 49-58.
- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, p. 87-90, 1986.
- BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 40, p. 129-134, 1976.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729-770, 1998.
- BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* in soils: A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 246-256, 1999.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; de-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 99-103, 1991.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2429-2434, 1989.

BAUER, P. et al. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. **Plant Journal**, v. 10, p. 91-105, 1996.

BEATTIE, G. A. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Netherlands: Springer, 2007. p. 1-56.

BECKER, A.; FRAYSSE, N.; SHARYPOVA, L. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, p. 899-905, 2005.

BEN DEKHIL, S. et al. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 1997.

BERDY, J. Part 1. In: DEBABOV, V. G.; DUDNIK, Y. V.; DANILENKO, V. N. (Eds.). **The biology of actinomycetes**. New York: Allerton Press, p. 3, 1996.

BHATTACHARYYA, R. M.; BASU, P. S. Bioproduction of different phytohormones in root nodules of *Crotalaria retusa* L. and by its symbiont. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29, p. 664-667, 1991.

BHOWMICK, P. K.; BASU, P. S. Contents of hormones, and indoleacetic acid metabolism in root nodules of *Erythrina indica* Lamk., *Sesbania grandgora* Pers., and *Pterocarpus santalinus* Linn. **Biochemistry and Physiology Pflanzen**, v. 179, p. 455-462, 1984.

BIEDERBECK, V. O. et al. Effect of long-term rotation with lentils on rhizosphere ecology and on endophytic *Rhizobia* in wheat. In: **North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation**, 17., 2000, Quebec. *Anais...* Quebec: Laval University, 2000, p. 23-28.

BORGHI, E.; CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade de milho, espaçamento e modalidade de consorciação com *Brachiaria brizantha* em sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 163-171, 2007.

BOTTINI, R. et al. Identification of gibberellins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 155-194, 2005.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 1075-1080, 1971.

BROUGHTON, W. J. et al. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, v. 13, p. 243-253, 1992.

CACCIARI, I. et al. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, p. 151-153, 1989.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 26).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Experimentação em rede nacional para recomendação de estirpes de *Bradyrhizobium* e inoculantes. In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1998**. Embrapa Soja, Londrina, p. 53-57, 1999. (Embrapa Soja. Documentos, 125).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Experimentação em rede nacional para recomendação de estirpes de *Bradyrhizobium* e inoculantes. In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 2000**. Embrapa Soja, Londrina, p. 13-17, 2001. (Embrapa Soja. Documentos, 163).

CAMPO, R. J. et al. Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação em diferentes regiões do Brasil. In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 2001**. Embrapa Soja, Londrina, p. 30-35, 2002. (Embrapa Soja. Documentos, 197).

CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 583-592, 2001.

CARLSON, R. W. et al. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type-1 and type-2 strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Biology and Biochemistry**, v. 268, p. 18372-18381, 1993.

CASSÁN, F. et al. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp.: Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Eds.). **Azospirillum sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 59-84.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

CHAHBOUNE, R. et al. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2922- 2927, 2011.

CHARENTREUIL, C. et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5437-5447, 2000.

CHANG, Y. I. et al. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2496-2502, 2011.

CIB – CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Guia do milho: tecnologia do campo à mesa**. Disponível em:
http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf. Acesso em: 16 novembro 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira – grãos – safra 2012/2013 – primeiro levantamento**. Brasília: Conab, 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Série histórica relativa às safras 1976/77 a 2010/11 - Soja**. Disponível em:
http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos. Acesso em: 17 junho 2011.

CORREA, O. S. et al. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Eds.). ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 85-94.

CRISPINO, C. C. et al. **Adubação nitrogenada na cultura de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 6p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 75).

CROZIER, A. et al. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

CRUZ, F.A.B. A importância do cultivo de milho na sustentabilidade do agronegócio. **Boletim Técnico do Milho**, Luís Eduardo Magalhães, n. 2, p. 18-19, mar./2011.

CULLIMORE, J. V.; RANJEVA, R.; BONO, J. J. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 24-30, 2001.

D’COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistance. **Science**, v. 311, p. 374-377, 2006.

DANGAR, T. K.; BASU, P. S. Studies on plant growth substances, IAA metabolism and nitrogenase activity in root nodules of *Phaseolus aureus* Roxb. var. *mungo*. **Biology Plant**, v. 29, p. 350-354, 1987.

DANTAS, G. et al. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**, v. 320, p. 100-103, 2008.

DARDANELLI, M. S. et al. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2713-2721, 2008.

DAVIES, J. Introduction. In: **Secondary metabolites: their function and evolution**. Cyba Foundation Symposium 171. England: John Wiley and Sons Ltd., 1992, p. 54-58.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: Physiology, biochemistry, and molecular biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-12, 1995.

DE JONG, A. J. et al. A plant somatic embryo mutant is rescued by rhizobial lipooligosaccharides. **The Plant Cell**, v. 5, p. 615-620, 1993.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology – a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1275-1288, 2004.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259-264, 1998.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In: SCHEPER, T. (Ed). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlin: Springer Verlag, 2000, p. 1-39.

DENARIE, J.; CULLIMORE, J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Cell**, v. 74, p. 951-954, 1993.

DEPOLLI, H; FRANCO, A. A. **Inoculação de sementes de leguminosas**. Seropédica: Embrapa UAPNBS, 1985. 31 p. (Embrapa UAPNBS. Circular Técnica, 1).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v. 34, n. 7, p. 869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION. **Proceedings**. NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. (eds.), Washington State University Press, v. 1, p. 518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O.; **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Springer-Verlag, 1987. 155 p.

DOBRINDT, U. et al. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 157-161, 2004.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C. **A evolução da produção de milho no Mato Grosso: a importância da safrinha**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 150).

DUDMAN, W. F. Structural studies of the extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* strains 71A, CC708, and CB1795. **Carbohydrates**, v. 66, p. 9-23, 1978.

DYACHOK, J. V. et al. Rhizobial nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 290-297, 2000.

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2004**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em 23 novembro 2011.

ERNANI, P. R. **Disponibilidade de nitrogênio e adubação nitrogenada para macieira**. Lages: Graphel, 2003. 76 p.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames, Iowa: Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology, 1977. (Special report, 80).

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Fields Crop Research**, v. 79, p. 139-152, 2002.

FISHER, R. F.; LONG, S. R. Interactions of NodD at the *nod* Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 233, p. 336-348, 1993.

FISHER, R. F.; LONG, S. R. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, v. 357, p. 655-660, 1992.

FOSTER, H. A. et al. Antibiotic activity of soil myxobacteria and its ecological implications. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 10, p. 27-32, 1992.

FRANKENBERGER, W. T.; ARSHAD, M. **Phytohormones in Soils: Microbial production and function**. New York: Marcel Dekker, 1995. 503 p.

FREIRE, J. R. J.; VIDOR, C. Rizobiologia. Estudos no Estado do Rio Grande do Sul. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). **A soja no Brasil**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil, p. 417-425, 1981.

FULCHIERI, M.; LUCANGELI, C.; BOTTINO, R. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1305-1309, 1993.

FUNDAÇÃO RIO VERDE. Avaliação da eficiência agrônômica do fertilizante biológico Nitragin LCO Foliar (molécula LCO) como promotor do crescimento e para tratamento foliar na cultura da soja. In: **Fundação Rio Verde – Boletim Técnico nº 20 – Sistemas de Produção Soja Safra 2011/2012 – Milho Segunda Safra 2012**. Fundação Rio Verde, Lucas do Rio Verde, p. 59-65, 2012a.

FUNDAÇÃO RIO VERDE. Produtividade do milho em função do pré-tratamento de sementes com bactérias *Azospirillum brasilense* e moléculas biológicas promotoras do crescimento de plantas (LCO) em diferentes doses de nitrogênio. In: **Fundação Rio Verde – Boletim Técnico nº 20 – Sistemas de Produção Soja Safra 2011/2012 – Milho Segunda Safra 2012**. Fundação Rio Verde, Lucas do Rio Verde, p. 101-108, 2012b.

GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Aldonic acids: a novel family of *nod* genes inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupine*, and *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 988-998, 1998.

GARCIA DE SALAMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 168f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

GIRAUD, E. et al. Legume symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic Bradyrhizobia. **Science**, v. 316, p. 1307-1311, 2007.

GONZÁLEZ, J. B.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 322-333, 2003.

- GONZÁLEZ, J. E.; REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows invasion in *Medicago sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 8636-8641, 1996.
- GOUGH, C. *Rhizobium* symbiosis: Insights into Nod factors receptors. **Current Biology**, v. 13, p. 973-975, 2003.
- GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, v.35, p.511–517, 1964.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater utilization. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.
- GROPPIA, M. D.; ZAWOZNIK, M. S.; TOMARO, M. L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. **European Journal of Soil Biology**, v. 34, n. 2, p. 75-80, 1998.
- GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 936-943, 1978.
- HAAHTELA, K. et al. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 203-206, 1981.
- HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J.; BENNETT, J. M.; SINCLAIR, T. R.; PAULSEN, G. M. (Eds.). **Physiology and determination of crop yield**. American Society of Agronomy, 1994. Cap. 11^a, p. 285-302.
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed). **Azospirillum – Plant Associations**. Boca Ratón: CRC Press, 1994, p. 15-39.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annual Microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.
- HENNING, A. A.; CAMPO, R. J.; SFREDO, G. J. **Tratamento com fungicidas, aplicação de micronutrientes e inoculação de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1997. 7p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 58).
- HIRSCH, P. R. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 113, p. 219-228, 1979.
- HOLTSMARK, I. et al. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 280, p. 1-7, 2008.
- HORVATH, B. et al. Lipo-chito-oligosaccharide of *Rhizobium* induces infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. **The Plant Journal**, v. 4, p. 727-733, 1993.
- HUBBELL, D. H. et al. Physiological interactions in the *Azospirillum*-grass root association. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. (Eds.). **Associative N₂-Fixation**. CRC Press, Boca Ratón, p. 1-6, 1979.
- HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIADESALAMONE, I. (Eds.). **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions, and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-36.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 3, p. 339-364, 1994.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994.

HUNGRIA, M. et al. Resultados de reinoculação da soja com estirpes de *Bradyrhizobium* no Estado do Paraná. In: **Resultados da Pesquisa da Soja 1996**. Embrapa CNPSo, Londrina, p. 52-54, 1997. (Embrapa Soja. Documentos, 104).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura de soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. (Embrapa Soja, Documentos, 283). Londrina, Embrapa Soja, 2007. 80 p.

HUNGRIA, M. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Eds.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006. p. 43-93.

HUNGRIA, M. et al. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. et al. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v. 97, p. 751-758, 1991.

HUNGRIA, M. et al. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, E. D.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Series: Nitrogen fixation: origins, applications, and research Progress. v. 4. Amsterdam: Springer, p. 223-254, 2005b.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Exploring the microbial diversity and soil management practices to optimize the contribution of soil microorganisms to plant nutrition. In: STACEY, G.; MULLIN, B.; GRESSHOFF, P. M. (Eds.). **Biology of plant-microbe interactions**. International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, p. 493-496, 1996 (Proceedings of the 8th International Symposium Molecular Plant-Microbe Interactions).

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., (Eds) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, v.2, p.9-89, 1994.

HUNGRIA, M. et al. The Importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. 1. ed. v. 4. Netherlands: SPRINGER NETHERLANDS, p. 25-42, 2005a.

HUNTER, W. J. Production of the plant hormone ethylene by soybean roots and nodules. In: **Annual Meeting of American Society of Microbiology**, 92., 1992, Washington. *Anais...* Washington: American Society of Microbiology, 1992. p. 307.

HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2645-2654, 2011.

INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; HIRANO, S. Elicitor actions of *N*-acetylchito oligossacharides and laminarioligossacharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 61, p. 975-978, 1997.

ISLAM, M. S. et al. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 72, p. 1416-1429, 2008.

ITAKURA, M. et al. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other Bradyrhizobiaceae members. **The ISME Journal**, v. 3, n. 3, p. 326-339, 2009.

JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 206-210, 1985.

JORDAN, D. C.; Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136–139, 1982.

KACEM, M. Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15). **Grasas Y Aceites**, v. 58, p. 136-141, 2007.

KANEKO, T. et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. **DNA Research**, v. 9, p. 189-197, 2002.

KANESHIRO, R.; SLODKI, M. E.; PLATTNER, R. D. Tryptophan catabolism of indolepyruvic and indoleacetic acids by *Rhizobium japonicum* L-259 mutants. **Current Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 1983.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rizosphere soils. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 679-693, 1989.

KIRICHENKO, E. V.; TITOVA, L. V.; YA-KOTS, S. The significance of exometabolites in the formation and operation of soybean-*Rhizobium* symbiosis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 490-493, 2004.

KOLB, W.; MARTIN, P. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and the application of indole acetic acid. In: KLINGMÜLLER, W. (Ed.). **Azospirillum III: Genetics, physiology, ecology**. Springer-Verlag, Berlin, p. 215-221, 1985.

KOSENKO, L. V.; KHAILOVA, G. F.; KORELOV, V. E. Fiziology Biokhim. **Kul's Rast.**, v. 33, n. 4, p. 347-354, 2001.

KOSSLAK, R. M. et al. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America**, v. 84, p. 7428-7432, 1987.

KOUCHI, H. et al. Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. **The Plant Journal**, v. 18, p. 121-129, 1999.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 501-505, 1992.

- LANG, K. et al. The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular and Genetics Genomics**, v. 279, p. 203-211, 2008.
- LAUS, M. C.; Van BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 533-538, 2005.
- LAVRINENKO, K. et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2832-2837, 2010.
- LEE, K. H.; LaRUE, T. A. Ethylene as a possible mediator of light and nitrate-induced inhibition of nodulation of *Pisum sativum* L. cv. Sparkle. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1334-1338, 1992.
- LEIBOVITCH, S. et al. Evaluation of the effect of SoyaSignal technology on soybean yield [*Glycine max* (L.) Merr.] under field conditions over 6 years in eastern Canada and the northern United States. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 187, p. 281-292, 2001.
- LIN, S. Y. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1185-1190, 2012.
- LIN, S. Y. et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 761-765, 2009.
- LONG, S. R.; COOPER, J. Overview of symbiosis. In: PALACISS, R.; VERMA, D. P. S. (Eds.). **Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. APS Press, St. Paul, 1988, p. 163-178.
- LOPES, E. S.; GIARDINI, A. R. Rizobiologia. Estudos no Estado de São Paulo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). **A soja no Brasil**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil, p. 425-436, 1981.
- LÓPEZ-LARA, I. M. et al. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulations host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 397-408, 1996.
- LOUREIRO, M. F. et al. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 665-674, 2006.
- LOUREIRO, M. F. et al. **Efeito da reinoculação e da adubação nitrogenada no rendimento da soja em Mato Grosso**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 4 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 74).
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Endophytic *Rhizobia* in barley and canola in rotation with field peas. In: **North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation**, 17., 2000, Quebec. *Anais...* Quebec: Laval University, Quebec, 2000. p. 51.
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W.; Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, v. 15, p. 289-321, 2005.
- MABOOD, F. et al. Exploiting inter-organismal chemical communication for improved inoculants. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 951-966, 2006.

MABOOD, F.; JUNG, W. J.; SMITH, D.L. Signals in the underground: microbial signaling and plant productivity. In: NAUTIYAL, C. S.; DION, P. (Eds.). **Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence**. Berlim: Springer-Verlag, 2008. p. 291-318.

MACHADO, A. T.; MAGNAVACA, R. **Estresse ambiental: o milho em perspectiva**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 47 p., 1991.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 12th Edition. USA: Benjamin Cummings, 2008.

MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, n. 4, p. 417-430, 1983.

MAHMOUD, S. A. Z. et al. Production of plant growth promoting substances by rizosphere microorganisms. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 139, p. 227-232, 1984.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. ANEXO à IN SDA 13, de 25/03/201. **Protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionado ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 13 junho 2011.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano ABC: Histórico**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/plano-abc/historico>. Acesso em: 01 novembro 2012.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa N° 13, de 24 de março de 2011**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 11 novembro 2012.

MAPLESTONE, R. A.; STONE, M. J.; WILLIAMS, D. H. The evolutionary role of secondary metabolites – a review. **Gene**, v. 115, p. 151-157, 1992.

MARGULIS, L.; FESTER, R. **Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis**. Cambridge: MIT Press, 1991.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MARTINI JÚNIOR, P. C. **Características agrônômicas da cultivar de trigo CD 114 submetido à aplicação de adubação nitrogenada em cobertura**. 2010. 16 f. Tese (Trabalho de Conclusão em Agronomia) – Curso de Agronomia, Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel. 2010.

McIVER, H. The use of legume/rhizobial signals for yield enhancement in non-leguminous crops. **Inoculant Forum 2005**, Saskatoon, Saskatchewan, March 17-18, 2005.

McGAW, B. A.; BURCH, L. R. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant Hormones: Physiology, biochemistry, and molecular biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 98-117, 1995.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p.337–342, 1995

McMANUS, P. S. et al. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 40, p. 443-465, 2002.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MILIC, V.; SARIC, Z.; VOROSBAYABYI, I.; MRKOVACKI, N. Relation between the content of growth regulators and effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum*. **Symbiosis**, v. 15, p. 183-193, 1993.

MINAMI, E. et al. Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, p. 574-583, 1996.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2ª Ed, 2006, 729p.

MORGENSTERN, E.; OKON, Y. The effect of *Azospirillum brasilense* on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*. **Arid Soils Restoration and Rehabilitation**, v. 1, p. 211-217, 1987.

MORT, A. J.; BAUER, W. D. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. **Journal of Biology and Biochemistry**, v. 257, p. 1870-1875, 1982.

MORT, A. J.; BAUER, W. D. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v. 66, p. 158-163, 1980.

MOURAD, K. et al. Antimicrobial activities of *Rhizobium* sp. strains against *Pseudomonas savastanoi*, the agent responsible for the olive knot disease in Algeria. **Grasas Y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 139-146, 2009.

MUELLER, C. C. **Dinâmica, condicionantes e impactos sócio-ambientais da evolução da fronteira agrícola no Brasil**. Instituto Sociedade, População e Natureza. Documento de Trabalho, n. 7, 1992.

NASSAR, N.; ORTIZ, R. Breeding cassava to feed the poor. **Scientific American**, v. 302, n. 5, p. 78-84, mai./2010.

NEW, P. B.; KENNEDY, I. R. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in eastern Australia. **Microbiology Ecology**, v. 17, p. 299-309, 1989.

NEWMAN, J.K. et al. *Rhizobium tropici* biopolymer modification of soils: dust control and soil stabilization. In: Army Science Conference, 27., 2010. [online] Disponível em: <http://www.armyscienceconference.com/manuscripts/L/LP-010.pdf>. Acesso em: 13 maio 2011.

- NICOLÁS, M. F. **Comparação da composição de polissacarídeos extracelulares em estirpes de *Bradyrhizobium* por HPLC**. 1996. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.
- NOBBE, F.; HILTER, L. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants. **U.S. Patent 570 813**, 1896.
- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 552-558, 2011.
- OKON, Y. et al. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* involved in root growth promotion. In: POLSINELLI, M.; NATERASSI, R.; VINCENZINI, M. (Eds.). **Nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publishers, Norwell, p. 113-125, 1991.
- OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-Inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, p. 3-16, 1986.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.
- OLIVEIRA, J. et al. Production of extracellular biopolymers and identification of intracellular proteins and *Rhizobium tropici*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 686-691, 2012.
- OLIVEIRA, L. R. **Análise da expressão dos genes *nodC* e *nodG* de *Rhizobium tropici* sob indução com flavonoides pela técnica de PCR quantitativo**. 2009. 87f. Tese (Mestrado em Microbiologia) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.
- OMURA, S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 3-4, p. 135-156, 1992.
- OSNAT, G.; NIGRO, L. M.; RILEY, M. A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 138-145, 2005.
- PATI, B. R.; SENGUPTA, R.; CHANDRA, A. K. Impact of selected phyllospheric diazotrophs on the growth of wheat seedlings and assay of the growth substances produced by the diazotrophs. **Microbiology Research**, v. 150, p. 121-127, 1995.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 17, p. 349-356, 1978.
- PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.
- PENNA, C. et al. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, v. 1, p. 1-21, 2011.
- PERES, J. R. R. **Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1979. 81f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1979.

- PERES, J. R. R. et al. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para a soja em solos de Cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, p. 357-363, 1993.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.
- PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; MAXWELL, C. A. Trigonelline and stachydrine released from alfafa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1526-1531, 1992.
- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1851-1864, 2007.
- PLESSNER, O.; KLAPATCH, T.; GUERINOT, M. L. Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1688-1690, 1993.
- POUPOT, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PROMÉ, J. C. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. **Biochemistry**, v. 32, p. 10430-10435, 1993.
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA – CASA CIVIL. **Subchefia para assuntos jurídicos**: Decreto nº 7.390, DE 09 DE DEZEMBRO DE 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Decreto/D7390.htm. Acesso em: 28 outubro 2012.
- PRINSEN, E. et al. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 282, p. 53-55, 1991.
- PUPPO, A.; RIGAUD, J. Cytokinins and morphological aspects of French-bean roots in the presence of *Rhizobium*. **Plant Physiology**, v. 42, p. 202-206, 1978.
- RAMÍREZ-BAHENA, M. H. et al. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrizus erosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1929-1934, 2009.
- RAO, A. V.; VANKATESWARLU, B. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 778-782, 1982.
- REDDY, P. M. et al. Rhizobial lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulin gene *ENOD12* in rice. **The Plant Journal**, v. 14, p. 693-702, 1998.
- REICHENBACH, H.; HÖFLE, G. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 2, p. 219-277, 1993.
- REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 43-51, 1987.
- REINHOLD, B. et al. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zone of Kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 520-526, 1986.

- RELIC, B. et al. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors on *Macroptilium atropurpureum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 764-774, 1993.
- RENNIE, R. J. Dinitrogen-fixing bacteria: computer assisted identification of soil isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 1275-1283, 1980.
- RIBEIRO, R. A. **Taxonomia e filogenia molecular de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2011. 109f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002.
- RIVAS, R. et al. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 101-110, 2009.
- RIVAS, R. et al. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1271-1275, 2004.
- RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oriza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.
- RODRÍGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.
- ROY, M.; BASU, P. S. Contents of hormones and indole acetic acid metabolism in root nodules of *Clitoria ternatea* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 30, p. 835-838, 1991.
- RURAL BR – TUDO SOBRE O AGRONEGÓCIO. **Preço da ureia agrícola sobe 19,4% em junho, conforme consultoria**. (2012). Disponível em: <http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2012/06/preco-da-ureia-agricola-sobe-19-4-em-junho-conforme-consultoria-3796340.html>. Acesso em: 14 outubro 2012.
- SANJUAN, J. et al. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 89, p. 8789-8793, 1992.
- SANTOS, H. P.; PIRES, J. L. **Porque semear milho**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. 11p. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 141).
- SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 251).
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate methods. **Letters of Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.
- SAUBIDET, M. I.; BARNEIX, A. J. Growth stimulation and nitrogen supply to wheat plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2565-2577, 1998.
- SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 215-222, 2002.

- SCHMIDT, J. et al. Studies on the function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**, v. 1, p. 150-155, 1991.
- SCHRIPSEMA, J. et al. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 366-371, 1996.
- SCHWINGHAMER, E. A.; BROCKWELL, J. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. **Journal of General Microbiology**, v. 9, p. 403-441, 1978.
- SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. **Analyst**, v.109, p. 549-568, 1984.
- SEKINE, M.; I. et al. Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamine in *Bradyrhizobium* spp. **Plant Cell Physiology**, v. 29, p. 867-874, 1988.
- SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas à base de *Azospirillum* spp. para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras**. 2006. 137f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/I.BUTANTAN, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- SKERMAN, V. B. D.; SLY, L. I.; WILLIAMSON, M. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a Sodium-Sensitive, Mixed-Flagellated Organism from Fresh Waters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 300-308, 1983.
- SMITH, R. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 485-492, 1992.
- SMITH, S. New patented growth promoter technology to enhance early season soybean development & grain yield. **Inoculant Forum 2005**, Saskatoon, Saskatchewan, March 17-18, 2005.
- SOULEIMANOV, A.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 376, p. 1929-1934, 2002.
- SPAINK, H. P. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 15, p. 559-582, 1996.
- SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Production of bacteriocins by root nodule bacteria. **International Journal of Agriculture Research**, v. 3, p. 161-165, 2008.
- STAEHELIN, C. et al. Perception of *Rhizobium* nodulation factor by tomato cells and inactivation by root chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 91, p. 2196-2200, 1994.
- STAUDT, A. **Identification of environmental factors critical to the production of exopolysaccharides by *Rhizobium tropici***. 2009. 76 f. Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Graduate Program in Civil Engineering and Geological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, 2009.
- STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197-206, 2012.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

STOKKERMANS, T. J. W. et al. *Bradyrhizobium japonicum* rhizobitoxine mutants with altered host-range on *Rj4* soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 6, p. 504-512, 1992.

STOKKERMANS, T. J. W. et al. Structural requirements of synthetic and natural product lipochitin oligosaccharides for induction of nodule primordial on *Glycine soja*. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1587-1595, 1995.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiology Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

STURTEVANT, D.; TALLER, B. J. Cytokinin production by a *Parasponia* nodule bacterium. In: **Annual Meeting of American Society of Microbiology**, 89., 1989, Washington. *Anais...* Washington: American Society of Microbiology, 1989. 300 p.

STURTEVANT, D.; TALLER, B. J. Effect of seed extract on cytokinin production by *Bradyrhizobium*. In: KEEN, N. T.; KOSUGE, T.; WALLING, L. L. (Eds.). **Physiology and Biochemistry of Plant-Microbe Interactions**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1988. 64 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1979.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

TULY, R. E. Synthesis of exopolisaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* during growth on hydroaromatic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1624-1626, 1988.

VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J. M.; EARDLY, B. D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 207-215, 2006.

VANDE BROEK, A. et al. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacteria *nifH* gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 5921-6000, 1993.

VARGAS, M. A. T. et al. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Eds.). **Cerrado: Correção do solo e adubação**. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brasil, p. 97-127, 2002.

VARGAS, M. A. T. et al. **Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: Embrapa CPAC, 1992. 3p. (Embrapa CPAC. Comunicado Técnico, 62).

- VARGAS, M. A. T. et al. Reinoculação da soja em função dos serogrupos de *Rhizobium japonicum* predominantes em solos de Cerrados. In: **Seminário Nacional de Pesquisa de Soja**, 2., 1981, Londrina. *Anais...* Londrina: Embrapa CNPSo, 1981. p. 715-722.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.
- VINUESA, P. et al. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 569-575, 2005.
- VITTI, G.C.; BARROS JÚNIOR, M.C. **Diagnóstico da fertilidade do solo e adubação para alta produtividade de milho**. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Eds.). *Milho: tecnologia e produtividade*. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001. p.179-222.
- WALTON, D. C.; LI, Y. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: Physiology, biochemistry, and molecular biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 140-157, 1995.
- WANG, T. L.; WOOD, E. A.; BREWIN, N. J. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas: Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strains of *R. leguminosarum*. **Planta**, v. 155, p. 345-349, 1982.
- WILLIAMS, A. et al. Glucosaminan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4706-4715, 2008.
- WONG, P.; STENBERG, N. E. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of harvested sorghum plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 1189-1191, 1979.
- WOYKE, T. et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. **Nature**, v. 443, p. 950-955, 2006.
- XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oriza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.
- XU, L. M. et al. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, p. 706-711, 1995.
- YANNI, Y. G. et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.
- YAO, Z. Y. et al. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2219-2230, 2002.
- YOUNG, C. C. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 959-963, 2008.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, de P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 25, p. 569-576, 2001.

ZAYAS, L. M. **Caracterización a nivel genético y molecular de la producción de bacteriocina por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25**. 2005. 364f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Espanha, 2005.

ZHANG, Y. M. et al. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1951-1957, 2012.

ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura de soja em Roraima. **Revista Agroambiente Online**, v. 4, n. 2, p. 56-61, 2010.

ANEXOS

ARTIGO

Applied Microbiology and Biotechnology Express

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF RHIZOBIAL METABOLITES TO ENHANCE THE PERFORMANCE OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* INOCULANTS WITH SOYBEAN AND MAIZE

Bettina Berquó Marks^{1,2,3}, Manuel Megías⁴, Marco Antonio Nogueira¹, Mariangela Hungria^{1,2,*}

E-mails:

bettinamarks@gmail.com

megiasg@us.es

nogueira@cnpso.embrapa.br

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF RHIZOBIAL METABOLITES TO ENHANCE THE PERFORMANCE OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* INOCULANTS WITH SOYBEAN AND MAIZE

ABSTRACT

Agricultural sustainability may represent the greatest encumbrance to increasing food production. On the other hand, as a component of sustainability, replacement of chemical fertilizers by bio-fertilizers has the potential to lower costs for farmers, to increase yields, and to mitigate greenhouse-gas emissions and pollution of water and soil. Rhizobia and plant-

¹ Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil

² Universidade Estadual de Londrina, Dept. de Microbiologia, Londrina, PR, Brazil

³ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil

⁴ Universidad de Sevilla, Dept. de Microbiología y Parasitología, Sevilla, Espanha.

* Corresponding author:

Mariangela Hungria

Embrapa Soja

Cx. Postal 231

86001-970 Londrina, Paraná, Brazil

Fax: (+55)4333716100

Telephone: (+55)4333716206

E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br; hungria@pq.cnpq.br

growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been broadly used in agriculture, and advances in our understanding of plant-bacteria interactions have been achieved; however, the use of signaling molecules to enhance crop performance is still modest. In this study, we evaluated the effects of concentrated metabolites (CMs) from two strains of rhizobia, *Bradyrhizobium japonicum*, USDA 110 (BJ1) and *Rhizobium tropici* CIAT 899 (RT1)—at two concentrations of active compounds (10^{-8} and 10^{-9} M)—on the performances of two major plant-microbe interactions, of *B. japonicum*-soybean and *Azospirillum brasilense*-maize. For soybean, one greenhouse and two field experiments were performed and effects of addition of CMs from the homologous and heterologous strains, and of the flavonoid genistein were investigated. For maize, three field experiments were performed to examine the effects of CM from RT1. For soybean, compared to the treatment inoculated exclusively with *B. japonicum*, benefits were achieved with the addition of CM-BJ1; at 10^{-9} M, grain yield was increased by an average of 4.8%. For maize, the best result was obtained with the addition of CM-RT1, also at 10^{-9} M, increasing grain yield by an average of 11.4%. These benefits might be related to a combination of effects attributed to secondary compounds produced by the rhizobial strains, including exopolysaccharides (EPSs), plant hormones and lipo-chitooligosaccharides (LCOs). The results emphasize the biotechnological potential of using secondary metabolites of rhizobia together with inoculants containing both rhizobia and PGPR to improve the growth and yield of grain crops.

Keywords: *Azospirillum* - *Bradyrhizobium* - *Glycine max* - LCO - *Rhizobium* - *Zea mays*.

INTRODUCTION

Sustainability probably represents the greatest challenge to increasing food production. Year after year, the agricultural sector is forced to adopt new technologies to maintain high yields—without clearing new land for agriculture—and to minimize degradation of land that is occurring worldwide. Since the Green Revolution, the use of chemical fertilizers has played a key role in increasing yields; however, costs are often a major limitation to farmers in developing and poor countries, whereas, for developed countries, pollution of water and soil by fertilizers and greenhouse-gas emissions (GGEs) are sources of concern.

Bio-fertilizers can help meet the demands of sustainable, productive agriculture at low cost. Rhizobial inoculants have been applied to legume crops for over 120 years as bio-fertilizers, and inoculants carrying plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been used in agriculture for over half a century (Okon and Labandera-Gonzalez 1994; Bashan and Bashan 2005; Hungria et al. 2005; Ormeño-Orrillo et al. 2012a). Considered safe, inoculants have been focus of hundreds of basic and applied studies.

For rhizobial inoculants, a molecular dialogue between the host plant and the bacterium results in root nodulation and nitrogen fixation, involving plant flavonoids and bacterial nodulation (Nod) factors, identified as lipo-chitooligosaccharides (LCOs) (Schultze and Kondorosi 1996; Hungria and Stacey 1997; Perret et al. 2000; Oldroyd and Downie 2008; Ferguson et al., 2010); however, the roles of other molecules, such as those related to type-III secretion systems and EPSs (Perret et al. 2000; Fauvart and Michiels 2008; Downie 2010) have also been emphasized.

A broad range of beneficial effects has been reported for PGPR, including biological nitrogen fixation (Ashraf et al. 2011), phosphate solubilization (Rodriguez et al. 2004), and production of hormones, such as auxins, cytokinins, gibberelins and ethylene (Tien et al. 1979; Bottini et al. 1989; Strzelczyk and Kamper 1994) and control of pathogens (Araújo et al. 2005; Hernandez-Rodriguez et al. 2008; Wang et al. 2009), among others. However, our understanding of the molecular interactions of host plants with PGPR is still modest.

Despite results showing benefits of specific molecules to the performance both of rhizobia, e.g. by a supply of the flavonoids to soybean and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Hungria and Phillips 1993; Hungria and Stacey 1997), and of PGPR, e.g. by a supply of crude or formulated metabolites of *Bacillus subtilis* (Araújo and Hungria 1999), the use of molecules to enhance crop performance under field conditions is incipient, highlighting the imbalance between basic knowledge and exploitation of biotechnological products in agriculture.

One exception is commercially available inoculants for soybean crops carrying Nod factors (Supanjani et al. 2005; Smith et al. 2012); however, responses in the field have often been of slight and/or erratic, or dependent on specific conditions (Leibovitch et al., 2002). It could be that the problem lies in applying single molecules and that improved results may accrue with crude or formulated metabolites carrying several molecules (e.g., Araújo and Hungria 1999).

In this study, we evaluated the use of concentrated rhizobial metabolites on the performances of the two major grain crops that are frequently inoculated in South America, the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean and *Azospirillum brasilense*-maize associations.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

For maize (*Zea mays* L.), liquid inoculants were prepared with *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, each at a concentration of 2×10^8 cells mL⁻¹. These strains, identified in a previous selection program (Hungria et al. 2010), and are broadly used in commercial inoculants in Brazil.

For soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], liquid inoculants were prepared with *Bradyrhizobium japonicum* strains CPAC 15 (=SEMIA 5079) and CPAC 7 (=SEMIA 5080), the combination most used in commercial inoculants in Brazil (Hungria et al. 2006), each at a concentration of 5×10^9 cells mL⁻¹.

For the production of concentrated metabolites, a search was performed among more than fifty strains of bacteria in the culture collections of the Universidad de Sevilla and of Embrapa Soja. Several properties potentially beneficial for plant growth were investigated, including the production of plant hormones (indole acetic acid, cytokinin, gibberelin), production of exopolysaccharides (EPSs), and capacity to enhance soybean nodulation under controlled conditions. Two strains were identified: *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *B. japonicum* USDA 110, here named RT1 and BJ1, respectively.

Concentrated metabolites

Concentrated metabolites (CMs) were produced from RT1 and BJ1, grown under conditions that enhance production of molecules beneficial to plant growth, as described before (Dardanelli et al. 2012). Metabolites were lyophilized, and effects of protectors, such as carbon methyl cellulose (CMC), bovine serum albumin (BSA) and milk powder were investigated. The process of producing the concentrated metabolites maintaining more than 90% of the original properties is now under registration. Shelf-life of the lyophilized CMs was confirmed for 24 months, when the activity corresponded to 90% of that of the fresh metabolites.

Seed inoculation

Prior to sowing, CMs were re-suspended in a mixture of acetonitrile and water at concentrations of 0.1 mL L⁻¹ and 1 mL L⁻¹ of inoculant, corresponding to approximately 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M, respectively. Inoculants for soybean (with *B. japonicum*) and for maize (with *A. brasilense*) were tested with and without CMs. For soybean, homologous and heterologous CMs were used, i.e., BJ1 and RT1, respectively, while for maize only RT1 was evaluated.

Inoculants were applied to supply approximately 1.2×10^5 cells of *A. brasilense* per seed of maize, and of 1.2×10^6 cells of *B. japonicum* per seed of soybean, as recommended for both crops in Brazil.

For the greenhouse experiments, soybean seeds were surface-sterilized (Vincent 1970), and then inoculated by mixing the liquid inoculants with the seeds. For the field experiments, soybean and maize seeds were not surface sterilized and the inoculants were mixed with the seeds immediately before sowing. CMs were added to the inoculants before seed inoculation.

Greenhouse experiment

Differences in soybean nodulation may be difficult to detect in soils with indigenous or naturalized populations of compatible bradyrhizobia, as is the case for most soils in Brazil cropped with this legume. Therefore, for the soybean, one experiment was also performed under greenhouse conditions, using modified Leonard jars (Vincent 1970) containing sterilized substrate, consisting of a mixture of sand and pulverized coal (1:1, v/v) with application of N-free nutrient solution (Andrade and Hamakawa 1994).

The experiment consisted of seven treatments, including a non-inoculated control and all the others inoculated with *B. japonicum* strains CPAC 15 and CPAC 7, supplied or not with genistein (5 µM), or with CM-BJ1 or CM-RT1, at 0.1 or 1.0 mL L⁻¹. The jars were arranged in a completely randomized block design with six replicates. Four seeds of soybean cultivar BRS 245 were sown per jar and thinned to two plants five days after emergence. Mean temperatures during the experiments were of 28/23°C (day/night), and the N-free nutrient solution was applied as needed.

Plants were harvested at 45 days after emergence. Shoots were detached at the cotyledonary nodes, roots were washed, and nodules were removed and counted. Weight of shoots, roots and nodules were determined after drying to constant weight at 65°C (approximately 72 h). Shoots were ground (20 mesh) and total N was determined by

Kjeldahl's digestion method followed by the indophenol-blue colorimetric assay (Feije and Anger 1972).

Field experiments

Site descriptions

Two field experiments were conducted with soybean and three with maize in the summer cropping season of 2011/2012. The soybean experiments were performed in Bonito, State of Mato Grosso do Sul (central-west region), and Ponta Grossa, State of Paraná (southern region). Maize experiments were performed in Bonito, Ponta Grossa, and Três Lagoas, State of Mato Grosso do Sul.

In Bonito (21°07' S and 56°28' W) the area is at an altitude of 290 m and the soil is classified as Latossolo Vermelho Distrófico (Brazilian classification) (Typic Haplustox, Soil Taxonomy, USDA). The climate is classified as Aw (Köppen's classification) (tropical with dry winter). In Ponta Grossa (25°13' S and 50°1' W), at 880 m altitude, and the climate is classified as Cfb (temperate with mild summer). The trials were performed on a Latossolo Vermelho Distrófico (Brazilian classification) (Typic Hapludox, Soil Taxonomy, USDA). In Três Lagoas, altitude 310 m, the climate is Aw and the soil is also a Latossolo Vermelho Distrófico (Typic Haplustox).

At each site, two months before the experiments were planted, twenty soil samples (0–20 cm depth) were taken to evaluate chemical properties (Pavan et al. 1992), as described before (Hungria et al. 2006). For chemical analyses, the samples were previously dried (60°C for 48 h) and sieved (2 mm). Soil texture was determined after Embrapa (1997).

Soil chemical properties and granulometric fractions at each site are shown in Table 1. About fifty days before starting the experiment, lime was applied to alleviate acidity, based on soil pH values. The amount of applied lime was estimated for a base saturation of 70% to increase the pH to approximately 5.5.

In the experiments with soybean, the soil soybean-bradyrhizobial population was estimated using the most probable number (MPN) technique (Vincent 1970) and the statistical tables of Andrade and Hamakawa (1994) with soybean plants of cultivar BMX Potência RR[®] (BRASMAX) as trap host (Table 2).

Treatments and experimental design

For soybean, seven treatments were evaluated, consisting of a non-inoculated control and six treatments inoculated with *B. japonicum* strains CPAC 7 and CPAC 15, supplied or not with genistein (5 μM), and CMs of the homologous (CM-BJ1) or heterologous (CM-RJ1) species, at the 0.1 and 1.0 mL L⁻¹ of inoculant (10⁻⁹ and 10⁻⁸ M, respectively). The cultivar used was BMX Potência RR[®].

The experiment with maize consisted of six treatments. Three treatments were non-inoculated and receiving 0, 75 and 100% of the dose of N-fertilizer at the V4 stage, as specified in the field management item. The other three treatments received 75% of the dose of N-fertilizer, were inoculated with *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 and received or not CMs of *R. tropici* (CM-RT1) at 0.1 and 1.0 mL L⁻¹ (10⁻⁹ and 10⁻⁸ M, respectively). The hybrid maize used was DKB 350 YG (DEKALB).

The experimental design was a completely randomized block with six replicates. For soybean, each plot had eight rows, spaced by 0.5 m, with 4 m (width) \times 6 m (length) (24 m²). For maize, the plots had six rows, spaced 0.8 m, with 4.8 m (width) \times 6 m (length) (28.8m²). Plots were separated by at least 1.0 m and, where necessary, small terraces of approximately 1.5 m width were built to prevent contamination by superficial run-off containing bacteria or fertilizer, caused by heavy rains that often occur in the summer season.

Field management

Densities were of about 300,000 plants ha⁻¹ for soybean and of 60,000 plants ha⁻¹ for maize. For both crops, 300 kg ha⁻¹ of N-P-K (0-28-20) were applied in-furrow immediately before sowing. For soybean, no N-fertilizer was applied, and at V4 stage [four nodes on the main stem with fully developed leaves, beginning with the unifoliated node (Fehr and Caviness 1977), approximately 30 days after emergence] plants received 20 g ha⁻¹ of Mo (as Na₂MoO₄.2H₂O) and 2 g ha⁻¹ of Co (as CoCl₂.6H₂O) as foliar spray. For maize, 24 kg of N ha⁻¹ (urea) were applied to all treatments at sowing, in-furrow, and, 30 days after emergence, plants received 0, 75 or 100% of the recommended dose for the crop, of 90 kg of N ha⁻¹ (urea), broadcast.

For both crops, herbicides were used equally in all treatments, while insects were controlled with biological and chemical insecticides. Sowing and harvesting days and harvested area to evaluate grain yield in each experiment are shown in Table 2.

Plant sampling, harvesting and analyses

For the soybean, at the V4 stage (Fehr and Caviness 1977) six plants were randomly collected per plot (avoiding central rows, to be used for determination of grain yield) for evaluation of nodulation [nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) per plant]. At R2 stage (full bloom), another six plants were collected for evaluation of shoot dry weight (SDW) and total N in shoot (TNS). Dry weight was determined as described for the greenhouse experiment. The early evaluation of nodulation at V4 indicates effects of inoculation, since nodules formed later result from infection also by the indigenous rhizobial population. Shoots were ground (20 mesh) and TNS determined after Kjeldahl's digestion method, as described for the greenhouse experiment.

Maize plants were harvested at V4 stage (Iowa State University 1993) (fourth leaf fully expanded, approximately 35 days after emergence) for evaluation of SDW and TNS.

Grain yields of soybean and maize were determined at physiological maturity by harvesting a central area of each plot (Table 2). Grains were cleaned and weighed, with moisture content corrected to 13%.

Statistical analyses

Data from each experiment were first submitted to tests of normality and homogeneity of variances for each variable and then to analysis of variance (ANOVA). When confirming a statistically significant value in the F test ($p \leq 0.05$), a post hoc test (Duncan's multiple-range test at $p \leq 0.05$) was used as a multiple comparison procedure (SAS 1999).

RESULTS

Effects of inoculation with *B. japonicum* and of the supply of genistein or concentrated metabolites of rhizobia on soybean nodulation, growth and grain yield

Under greenhouse-controlled conditions and with a sterile substrate, soybean nodulation was significantly improved when, in addition to the inoculation with *B. japonicum*, seeds were supplied with genistein (5 μM), CMs of the homologous strain (CM-BJ1) (Table 3). The best performance was achieved with the addition of 1 mL L^{-1} CM-BJ1, statistically increasing nodule number (NN) and dry weight (NDW) by 21% and 12%, respectively, in comparison to sole inoculation with *B. japonicum*. CM-BJ1 (1 mL L^{-1}) also resulted in higher values, although without statistical difference, of shoot and root dry weight (SDW, RDW), N content and total N in shoots (NC, TNS). In contrast, the CM of the heterologous strains (CM-RT1) did not improve nodulation (Table 3).

In the field trial carried out in Bonito, high NDW at the V4 stage and the highest grain yield were achieved with the addition of 0.1 mL L^{-1} CM-BJ1 (Table 4). Grain yield increase in this treatment was significantly higher in comparison to both the non-inoculated control nodulated by naturalized bradyrhizobial strains (205 kg ha^{-1} or 7.6%), and the treatment inoculated only with *B. japonicum* (203 kg ha^{-1} or 7.5%). At 1 mL L^{-1} of CM-BJ1, the increase in grain yield in comparison to the treatment with sole inoculation with *B. japonicum* was of 47 kg ha^{-1} (1.7%), statistically non-significant. Interestingly, the highest SDW at R2 stage was achieved with CB-RT1, also at the lower dose, but a strong inhibitory effect was observed with the higher dose of 1 mL L^{-1} (Table 4).

In Ponta Grossa, highest NDW at V4 was obtained with both doses of CM-BJ1, but with no statistical difference in comparison to the naturalized population and to the control inoculated solely with *B. japonicum* (Table 4). Additionally, although without statistical difference, an increase of 169 kg ha^{-1} (5.2%) was observed in grain yield in the treatment receiving 1 mL L^{-1} of CM-BJ1, and of 84 kg ha^{-1} (2.6%) at the lower dose of 0.1 mL L^{-1} . In this experiment, the addition of genistein also improved yield of inoculated plants by 146 kg ha^{-1} (4.5%), but the effect was not statistically significant. A decrease in SDW at R2 stage was observed with the supply of heterologous CM-RT1 (Table 4).

When the experiments were analyzed together, considering the treatment inoculated with *B. japonicum* as the control, the addition of the lower dose of active compounds (0.1 mL L^{-1}) resulted in increases of 29.0% in NN ($p \leq 0.05$, Duncan's test) and of 143.5 kg ha^{-1} (4.8%) in grain yield ($p \leq 0.09$, Duncan's test).

Effects of inoculation with *A. brasilense* and of concentrated metabolites of rhizobia on maize growth and grain yield

Under field conditions, in Bonito, at V4 stage, no differences were observed in SDW, but the highest N content (TNS) (although not differing statistically) was achieved with the CM-RT1 at the lower concentration (0.1 mL L^{-1}) (Table 5). At physiological maturity, the comparison of the treatments receiving 75% of N revealed that plants inoculated with *A. brasilense* and supplied with 0.1 mL L^{-1} of CM-RT1 resulted in a significant increase in grain yield ($1,045 \text{ kg ha}^{-1}$, or 19%) and, although not statistically significant, of 936 kg ha^{-1} (17%) in relation to the inoculated treatment without CM-RT1 (Table 5); for this last comparison, differences were significant at $p \leq 0.07$ (Duncan's test).

In Ponta Grossa, the best performance was achieved again in the treatment inoculated with *A. brasilense* supplied with CM-RT1 (0.1 mL L^{-1}), resulting in higher TNS at V4, statistically similar to the non-inoculated control receiving 100% of N-fertilizer (Table 5). In the comparison of the treatments receiving 75% of N-fertilizer, the highest grain yield was also observed in the treatment inoculated with *A. brasilense* supplied with 0.1 mL L^{-1} of CM-RT1 (Table 5).

A severe drought in Três Lagoas inhibited plant growth and reduced grain yield. Under these conditions, plant biomass at V4 was improved by addition of the full dose of N-fertilizer (Table 5). However, at the final harvest, higher grain yields were observed in the plants inoculated with *A. brasilense*, with and without CM. Although not differing statistically from the non-inoculated control with 75% of N-fertilizer, these two treatments increased grain yield by an average of 300 kg ha^{-1} (Table 5).

Considering the overall analysis of the three field experiments, statistically significant increases were obtained with the supply of 0.1 mL L^{-1} CM-RT1, of 614 kg ha^{-1} (11.4%), when compared to the treatment inoculated solely with *A. brasilense* and receiving 75% of N-fertilizer ($p \leq 0.05$, Duncan's test).

DISCUSSION

Modern agriculture has increasingly focused on the use of microbial products as alternatives to chemical fertilizers. Benefits from this replacement include substantially lower costs for farmers, less pollution and land degradation, and reduced concerns regarding adverse side effects on human health (Crews and Peoples 2004; Peoples et al. 2009; Saharan and Nehra 2011; Bakker et al. 2012). It is noteworthy that extensive use of rhizobial inoculants in Brazil, mainly with soybean, provides N with a value equivalent to US\$7 billion in fertilizers (Hungria et al. 2006; Hungria et al. 2007). Several countries—

including Brazil—benefit from the use of inoculants carrying PGPR, which may benefit crops by promoting uptake of nutrients and by increasing resistance to abiotic and biotic stresses, among other effects (Okon and Labandera 1994; Bacon and Hinton 2002; Bashan et al. 2004; Bashan et al. 2005; Hungria et al., 2010; Saharan and Nehra 2011). Currently, in Brazil, about 25 million doses of rhizobial inoculant for soybean and 2 million doses of inoculant containing *A. brasilense* for maize and wheat crops are produced annually. However, despite improved understanding, particularly over the past two decades, of molecular signaling in the rhizobia-legume interaction (e.g. Geurst and Bisseling 2002; Brencic and Winans 2005; Ferguson et al. 2010), as well as of other signals involved in host-microbe interactions (Brencic and Winans 2005), transfer of this knowledge to effective commercial products is still incipient.

In our study, we investigated the effects of supplying inoculants carrying *B. japonicum* and *A. brasilense* strains with concentrated metabolites (CMs) of selected rhizobial strains. For soybean, under greenhouse and sterile-substrate conditions we found that addition of the homologous concentrated metabolites (CM-BJ1) at the higher dose (1 mL L⁻¹ of inoculant) increased nodule number in comparison to the treatment inoculated solely with *B. japonicum*. Considering the field experiments individually, both doses of CM-BJ1 (0.1 and 1.0 mL L⁻¹, corresponding to 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M of active compounds, respectively) resulted in improvements in plant growth. Considering both field experiments, the addition of the lower dose resulted in increases of 23.6% in NN, and of 4.8% in grain yield. Interesting, positive effects were observed only with the metabolites from the homologous species, and the higher dose of the heterologous RT1 negatively affected nodulation and plant growth.

Secondary metabolites may provide an evolutionary advantage for survival of microbes in soil (Demain 1994), and they may also help in the establishment of symbiotic partnerships (Brencic and Winans 2005). Chemical analyses of the secondary metabolites contained in CM-BJ1 and CM-RT1 indicated that the benefits may result mainly from LCOs, but also from EPSs and plant hormones.

EPSs play important roles at several stages of the development of the root-nodule symbiosis (Frayse et al. 2003; Kirichenko et al. 2004; Becker et al. 2005; Downie 2010). Therefore, the addition of extra EPSs to inoculants may increase root infection. Furthermore, EPSs protect bacteria against stressful conditions, such as desiccation and osmotic and pH extremes, substantially increasing cell survival (Castellane and Lemos 2007); this feature may be critical for maintenance of bacterial viability in inoculants while on the shelf and after application to seeds or to the soil. Many plant-associated bacteria, including

rhizobia, synthesize plant growth hormones, such as auxins (Tien et al. 1979; Ashraf et al. 2011), gibberelins (Bottini et al. 1989), cytokinins (Tien et al. 1979; Strzelczyk et al. 1994) and ethylene (Strzelczyk et al. 1994). Recently, genomic sequences of *R. tropici* strains CIAT 899 and PRF 81 highlighted a variety of metabolic pathways related to plant-hormone synthesis (Ormeño-Orrillo et al. 2012b). Therefore, EPSs and plant hormones may have contributed to the observed increases in soybean performance and yield.

Lipo-chitooligosaccharides are known to affecting a number of physiological processes in the legume host plant, including root-hair curling and stimulation of division of cortical cells (Schultze and Kondorosi 1996; Hungria and Stacey 1997; Oldroyd and Downie 1998; Perret et al. 2000; Ferguson et al., 2010). It has also been demonstrated that LCO effects resemble those of cytokinins, and of the inhibitors of the transport of auxins (Relic et al. 1993); interestingly, they also activate enzymes related to plant defense (Inui et al. 1997). Finally, other benefits attributed to LCOs require further exploration, e.g., increases in seed germination (Miransari and Smith 2009). We attribute the effects observed in our study to LCOs; they are consistent with the activity of these compounds at concentrations as low as 10^{-12} M (Hungria and Stacey 1997). Activity at such low concentrations may be responsible for the differences observed between greenhouse and field experiments. In addition, it is known that the LCOs of *B. japonicum* are very specific, with a methyl-fucose moiety under the control of *nodZ* (Lugtenberg et al. 1996; López-Lara et al. 1996), which may explain the responses exclusively to homologous metabolites. Finally, in our study the addition of a plant molecular signal (genistein) was not as successful as the addition of LCOs, although the concentration applied (5 μ M) was much lower than doses previously reported for soybean and common bean (40 μ M) (Hungria and Stacey 1997). The effects of adding CM to the maize crop surpassed those observed with soybean. Considering three field experiments, increases in grain yield by the addition of CM-RT1 at the lower dose (10^{-9} M) were of 11.4%. The increases may be attributable to EPSs and plant hormones, and in the latter case, it is known that the effects are strongly dependent on concentration, and can be inhibitory at higher concentrations (Arshad and Frankenberger 1991), which may explain the better performance at the lower concentration of CM. In addition, benefits can also be attributed to the LCOs, which may activate cell division in non-leguminous plants, such as tobacco (*Nicotiana* sp.) (Baier et al. 1999), tomato (*Solanum lycopersicum*) (Stahelin et al. 1994), carrot (*Dacus carota*) (De Jong et al. 1993), and also maize (Khana et al. 2008). Often, the effects mimic those of plant hormones, such as cytokinins and auxins (Dyachok et al. 2000).

Interestingly, under greenhouse conditions Souleimanov et al. (2002) reported increases in soybean and maize biomass seven days after the addition of LCO (at 10^{-7} M) of *B. japonicum*.

In conclusion, the results from our study indicate biotechnological potential in the use of secondary metabolites of rhizobia—together with inoculants containing both rhizobia and PGPR—to improve growth and grain yields of crops of soybean and maize. Such improvements, which favor agricultural sustainability by bringing economic and environmental benefits, merit further investigation. However, it is noteworthy that a commercial product containing the CMs is now registered in Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), Projects Microrganismos Facilitadores do Crescimento (557746/2009-4), Repensa (562008/2010-1) and Ciência sem Fronteira (400205/2012-2). Authors acknowledge Dr. Allan R. J. Eaglesham for suggestions on the manuscript. B. Marks acknowledges an MSc fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and M.A. Nogueira and M Hungria are research fellows from CNPq (308443/2009-8 and 300547/2010-2, respectively).

REFERENCES

Andrade DS, Hamakawa PJ (1994) Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: Hungria M, Araujo RS (eds) Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia., Embrapa-SPI, Brasília, Brazil, pp 63-94.

Araújo FF, Hungria M (1999) Nodulação e rendimento de soja co-inoculada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii*. Pesq Agropec Bras 34(9):1633-1643.

Araújo FF, Henning AA, Hungria M (2005) Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. World J Microbiol Biotechnol 21(8-9):1637-1642.

Arshad M, Frankenberger WT (1991) Microbial production of plant hormones. Plant Soil 133:1-8.

Ashraf MA, Rasool M, Mirza MS (2011) Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv Biol Res* 5(6):348-355.

Bacon CW, Hinton DM (2002) Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biol Control* 23(3):274-284.

Baier R, Schiene K, Kohring B, Flaschel E, Niehaus K (1999) Alfafa and tobacco cells react differentially to chitin oligo-saccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors. *Planta* 210:157-164.

Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM, Weir TL, Vivanco JM (2012) Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil* 360:1–13.

Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50:521-577.

Bashan Y, Bashan LE (2005) Plant growth promoting. In: Hillel, D. (ed) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, U.K., 1:103-115.

Becker A, Fraysse N, Sharypova L (2005) Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:899-905.

Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis R (1989) Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol* 90:45-47.

Brencic A, Winans SC (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1):155–194.

Castellane TCL, Lemos EGM (2007) Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. *Pesq Agropec Bras* 42 (10):1503-1506.

Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ* 102:279–297.

Dardanelli MS, Córdoba FJF, Estévez J, Contreras R, Cubo MT, Rodríguez-Carvajal MA, Gil-Serrano AM, López-Baena FJ, Bellogín R, Manyani H, Ollero FJ, Megías M (2012) Changes in flavonoids

secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. *Appl Soil Ecol* 57:31-35.

De Jong AJ, Heidstra R, Spaink HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T, Schiavo FL, Terzi M, Bisseling T, van Kammen A, de Vries SC (1993) A plant somatic embryo mutant is rescued by rhizobial lipo-oligosaccharides. *Plant Cell* 5:615-620.

Demain AL (1998) Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl Microbiol* 1:259-264.

Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34:150-170.

Dyachok JV, Tobin AE, Price NPJ, von Arnold S (2000) Rhizobial nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Reports* 3:290-297.

Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1997) Manual de métodos de análise de solo, 2nd ed, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, Brazil, 212 pp.

Fauvert M, Michiels J (2008) Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 285(1):1-9.

Fehr WR, Caviness CE (1977) Stages of soybean development. Iowa State University, Ames.

Feije F, Anger V (1972) Spot test in inorganic analysis. *Anal Chem Acta* 149:363-367.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 52:61-76.

Fraysse N, Couderc F, Poinot V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* 270:1365-1380.

Geurt R, Bisseling T (2002) Rhizobium Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14 (Supplement) S239–S249.

Hernandez-Rodriguez A, Heydrich-Perez M, Acebo-Guerrero Y, Velazquez-Del Valle MG, Hernandez-Lauzardo NA (2008) Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Appl Soil Ecol* 39(2):180-186.

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2007) A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura de soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Embrapa Soja, Londrina, Brazil, 80 pp (Documentos 283).

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC, Graham PH (2006) Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: Singh RP, Shankar N, Jaiwal PK (eds.) Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity., Studium Press, LLC, Houston, Texas, USA, pp 43-93.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil 331:413-425.

Hungria M, Loureiro MF, Mendes IC, Campo RJ, Graham PH (2005) Inoculant preparation, production and application. In: Newton WE (ed.) Nitrogen fixation: Origins, applications and research progress, volume IV. Werner, W., Newton WE (eds.) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Springer, Dordrecht, Amsterdam, pp 223-254.

Hungria M, Phillips DA (1993) Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. Mol Plant-Microbe Interact 6(4):418-422.

Hungria M, Stacey G (1997) Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. Soil Biol Biochem 29:819-830.

Inui H, Yamaguchi Y, Hirano S (1997) Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. Biosci Biotechnol Biochem 61:975-978.

Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service (1993) How a corn plant develops. Ames, Iowa, Iowa State University (Special Report 48).

Khana W, Prithviraja B, Smith DL (2008) Nod factor [Nod Bj V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. J Plant Physiol 165:1342-1351.

Kirichenko EV, Titova LV, Ya-Kots S (2004) The significance of exometabolites in the formation and operation of soybean-*Rhizobium* symbiosis. Appl Biochem Microbiol 40(5):490-493.

Lopez-Lara IM, Bloktip L, Quinto C, Garcia ML, Stacey G, Bloemberg GV, Lamers GEM, Lugtenberg BJJ, Thomasoates JE, Spaink HP (1996) NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulations host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Mol Microbiol* 21:397-408

Leibovitch S, Migner P, Zhang F, Smith DL (2002) Evaluation of the effect of SoyaSignal technology on soybean yield [*Glycine max* (L.) Merr.] under field conditions over 6 years in eastern Canada and northern United States. *J Agron Crop Sci* 187(4):281-292

Miransari M, Smith D (2009) Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnol* 8(2):270-275.

Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591-1601.

Oldroyd GED, Downie AJ (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519-546.

Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martinez-Romero E (2012a) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.) *The prokaryotes: biodiversity and ecology*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LGP, Ollero FJ, Nicolás MF, Rodrigues EP, Nakatami AS, Batista JSS, Chueire LMO, Souza RC, Vasconcelos ATR, Megías M, Hungria M., Martínez-Romero E (2012b) Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13:735.

Pavan MA, Bloch MF, Zempulski HD, Miyazawa M, Zocoler DC (1992) *Manual de análise química do solo e controle de qualidade*. Londrina, Brazil, Instituto Agronômico do Paraná, 40 pp (Circular 76).

Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM, Dakora FD, Bhattarai S, Maskey SL, Sampet C, Rerkasem B, Khan DF, Hauggaard-Nielsen H, Jensen ES (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48(1-3):1-17.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol and Mol Biology Rev* 64:180-201.

Relic B, Talmont F, Korsinska J, Golinowski W, Prome JC, Broughton WJ (1993) Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:764-774.

Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91:552–555.

Saharan BS, Nehra V (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, v 2011: LSMR-21.

Schultze M, Kondorosi A (1996) The role of lipochitooligosaccharides in root nodule organogenesis and plant cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 6(5):631-638.

Smith S, Gygi B, Habib A, Kang Y (2012) Basic and applied understanding of signal molecules from rhizobia (Lipo-chitooligosaccharides) contributes to better crop production. Soy2012 Speaker Abstracts. Available at: <http://www.extension.iastate.edu/registration/events/soybean/speakeranchor.htm>.

Souleimanov A, Prithiviraj B, Smith DL (2002) The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J Exp Bot* 53(376):1929-1934.

Stahelin C, Granado J, Muller J, Wiemecken A, Mellor RB, Felix G, Regenass M, Broughton WJ, Boller T (1994) Perception of *Rhizobium* nodulation factor by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2196-2200.

Strzelczyk E, Kamper M, Li C (1994) Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol Res* 149:55-60.

Supanjani, FM, Souleimanov A, Lee KD, Smith DL (2005) Stability and activity of the major Nod factor produced by *Bradyrhizobium japonicum* following purification, sterilization, and storage. *Crop Sci* 45(4):1281-1285.

Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37:1016-1024.

Vincent JM (1970) Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, UK, Blackwell. (International Biological Programme Handbook, 15).

Wang S, Huijun W, Junqing Q, Lingli M, Jun L, Yanfei X, Xuewen G (2009) Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. J Microbiol Biotechnol 19(10):1250-1258.

TABLES

Table 1 - Chemical and granulometric properties (0-20 cm) of the soils where the field experiments were performed

Site	Chemical										Granulometry		
	pH ¹	P	H+Al	Al	K	Ca+Mg	SB ²	CEC ²	BS ²	C	clay	silt	sand
	CaCl ₂	mgdm ⁻³	-----cmol _c dm ⁻³ -----					%	g dm ⁻³	----- g kg ⁻¹ -----			
Bonito	4.22	1.94	8.42	1.02	0.45	3.98	4.43	12.85	34	7.7	162	266	572
Ponta Grossa	5.68	2.55	3.63	0.00	0.11	4.55	4.66	8.29	56	21.7	238	30	732
Três Lagoas	5.23	7.04	2.95	0.00	0.08	1.93	2.01	4.95	40	25.7	86	44	870

¹Before addition of lime.

²SB, sum of bases; CEC, cation exchange capacity; BS, bases saturation = $[(K + Ca + Mg)/Tcec] \times 100$, where Tcec = K + Ca + Mg + total acidity at pH 7.0 (H + Al).

Table 2 - Agronomic information about the field trails.

Site	Crop	Soybean bradyrhizobia population (CFU g ⁻¹ soil)	Cultivar/Hybrid	Sowing	Harvest	Harvested area
Bonito	Soybean	<10	BMX Potência RR	10/27/2011	03/20/2010	7.5 m ²
	Maize	not evaluated	DKB 350 YG	10/28/2011	03/20/2012	8.4 m ²
Ponta Grossa	Soybean	9.32 × 10 ²	BMX Potência RR	11/23/2011	04/03/2012	7.5 m ²
	Maize	not evaluated	DKB 350 YG	11/24/2011	05/30/2012	8.4 m ²
Três Lagoas	Maize	not evaluated	DKB 350 YG	11/03/2011	02/29/2012	8.4 m ²

Table 3 - Nodulation [nodule number (NN) and dry weight (NDW)], plant growth [shoot and root dry weight (SDW, RDW)], N concentration (NC) and total N accumulated in shoots (TNS) of soybean cultivar BRS 245 inoculated or not with *Bradyrhizobium japonicum* strains CPAC 15 + CPAC 7 and supplemented or not with genistein (5 μ M) or concentrated metabolites (CMs) of *B. japonicum* (BJ1) or *Rhizobium tropici* (RT1). Experiment performed in Leonard jars, with sterile substrate and receiving N-free nutrient solution, under greenhouse conditions. Plants were harvested at 45 days after emergence.

Treatment	NN (n°pL ⁻¹)	NDW (mg pL ⁻¹)	SDW (gpL ⁻¹)	RDW (gpL ⁻¹)	NC (mg Ng ⁻¹)	TNS (mg N pL ⁻¹)
Non-inoculated control	zero ²	zero	0.81 b	0.51 b	6.57 b	5.19 b
Inoculated with <i>B. japonicum</i>	38.0b	162 a	1.31 a	0.77 a	19.38 a	25.5a
Inoculated + genistein	45.2 a	169 a	1.29 a	0.72 a	21.28 a	28.3 a
Inoculated + CM-BJ1 (1mL L ⁻¹) ¹	45.9 a	180 a	1.43 a	0.84 a	21.57 a	29.3 a
Inoculated + CM-BJ1 (0.1mL L ⁻¹)	42.5 a	140 a	1.22 b	0.63 ab	19.07 a	23.7 a
Inoculated + CM-RT1 (1mL L ⁻¹)	33.2 b	138 a	1.23 b	0.66 ab	20.65 a	25.3 a
Inoculated + CM-RT1 (0.1mL L ⁻¹)	32.5 b	128 a	1.14 ab	0.61 ab	19.81 a	22.9 a

¹ 0.1 and 1.0 mL L⁻¹ correspond to approximately 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M of active compounds, respectively.

² Data represent the means of six replicates and when followed by different letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$, Duncan's test).

Table 4 - Nodulation [nodule number (NN) and dry weight (NDW)], shoot dry weight (SDW), total N accumulated in shoots (TNS) and grain yield of soybean cultivar BMX Potência RR inoculated or not with *Bradyrhizobium japonicum* strains CPAC 15 + CPAC 7 and supplemented or not with genistein (5 μ M) or concentrated metabolites (CM) of *B. japonicum* (BJ1) or *Rhizobium tropici* (RT1). Experiments performed in two field sites in Brazil.

Treatments	Bonito					Ponta Grossa				
	V4		R2	Maturity		V4		R2	Maturity	
	NN (n°pl ⁻¹)	NDW (mg pl ⁻¹)	SDW (gpl ⁻¹)	TNS (mg N pl ⁻¹)	Yield (kg ha ⁻¹)	NN (n°pl ⁻¹)	NDW (mg pl ⁻¹)	SDW (gpl ⁻¹)	TNS (mg N pl ⁻¹)	Yield (kg ha ⁻¹)
Non-inoculated control	10.4 ab ²	43.2 b	18.4 ab	20.2 a	2701 b	45.7a	163 ab	10.4 ab	36.5 a	3166 a
Inoculated with <i>B. japonicum</i>	15.1 ab	68.4 a	13.3 ab	19.4 a	2703 b	42.0 a	149 b	10.4 ab	35.1 ab	3191 a
Inoculated + genistein	10.7 ab	43.6 b	14.4 ab	20.2 a	2737 ab	48.7a	171 ab	12.3 a	32.0 b	3337 a
Inoculated + CM-BJ1 (1 mL L ⁻¹) ¹	18.2 a	65.4 a	17.4 ab	17.6 a	2750 ab	52.5 a	206 a	12.1 a	34.6 ab	3359 a
Inoculated+ CM-BJ1 (0.1 mL L ⁻¹)	16.0 a	68.1 a	19.8 ab	17.6 a	2906 a	57.8 a	212 a	11.3 ab	34.6 ab	3275 a
Inoculated + CM-RT1 (1 mL L ⁻¹)	7.3 b	25.1 c	10.4 b	16.8 a	2641 b	45.3 a	170 ab	9.2 ab	33.4 ab	3202 a
Inoculated+ CM-RT1 (0.1 mL L ⁻¹)	13.4 ab	69.9 a	23.4 a	18.1 a	2817 ab	46.8 a	162 ab	8.9 b	35.3 ab	3253 a

¹ 0.1 and 1.0 mL L⁻¹ correspond to approximately 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M of active compounds, respectively.

² Data represent the means of six replicates and when followed by different letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$, Duncan's test).

Table 5 - Shoot dry weight (SDW) and total N accumulated in shoots (TNS) at V4 and grain yield at the maturity of maize hybrid DKB 350 YG inoculated or not *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 + Ab-V6 and supplemented or not with concentrated metabolites of *Rhizobium tropici* (CM-RT1). All plants received 24 kg of N ha⁻¹ at sowing and 0, 75 or 100% of N (90 kg of N ha⁻¹) at 30 days after emergence, broadcasted. Experiment performed in three field sites in Brazil.

Treatment/Site	Bonito			Ponta Grossa			Três Lagoas		
	V4			V4			V4		
	SDW (g pl ⁻¹)	TNS (mg pl ⁻¹)	Yield (kg ha ⁻¹)	SDW (g pl ⁻¹)	TNS (mg pl ⁻¹)	Yield (kg ha ⁻¹)	SDW (g pl ⁻¹)	TNS (mg pl ⁻¹)	Yield (kg ha ⁻¹)
0%N	13.1 a	402 a	5452 b	17.2 c	255 c	5708 c	7.1 c	161 b	2444 b
100%N	16.1 a	510 a	6184 ab	26.4 ab	558 ab	8483 a	9.7 a	252 a	2965 ab
75% N	12.4 a	407 a	5516 b	24.2 ab	511 b	7964 ab	9.4 ab	243 a	3010 ab
75% N + Inoculated with <i>A. brasilense</i>	14.0 a	412 a	5625 ab	22.1 bc	445 b	7208 b	7.9 bc	201 b	3319 a
75% N + Inoculated with <i>A. brasilense</i> + CM-RT1 (1 mL L ⁻¹)	11.5a	399 a	6091 ab	25.5 ab	542 ab	7707 ab	7.0 c	172 b	2972 ab
75% N + Inoculated with <i>A. brasilense</i> + CM-RT1 (0.1 mL L ⁻¹)	12.9 a	458 a	6561 a	29.5 a	669 a	8113 a	7.9bc	199 b	3322 a

¹ 0.1 and 1.0 mL L⁻¹ correspond to approximately 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M of active compounds, respectively.

² Data represent the means of six replicates and when followed by different letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$, Duncan's test).