

Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja

Interaction between nitrogen-fixing bacteria and nitrogen nutrition in soybean cultivation

LETÍCIA CAMPOS DE MELO

Discente de Agronomia (UNIPAM)

leticiacm@unipam.edu.br

EVANDRO BINOTTO FAGAN

Professor orientador (UNIPAM)

evbinotto@unipam.edu.br

Resumo: A soja é a cultura mais produzida no Brasil e é de grande importância agrícola, econômica e alimentícia. Por demandar elevadas quantidades de nitrogênio, o suprimento desse nutriente pode ocorrer via adubação nitrogenada ou por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Methylobacterium* e ureia na fixação biológica de nitrogênio e no metabolismo antioxidante na cultura da soja. O experimento foi instalado na casa de vegetação do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), localizada em Patos de Minas (MG), em 11 de abril de 2024, utilizando quatro tratamentos (T₁: Controle; T₂ Ureia 3 kg.ha⁻¹; T₃: *Methylobacterium symbioticum* 330 mL.ha⁻¹; T₄: *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* 2 mL.kg semente⁻¹), com cinco repetições. A cultivar de soja usada foi a M7601 I2X, sendo feitas as aplicações em tratamento de semente (T₄) e no estágio V₄ (T₂ e T₃). As avaliações de FBN foram realizadas 20 dias após a aplicação (DAA), e as análises do metabolismo antioxidante em 5, 11, 14 e 20 DAA, no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (UNIPAM). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os resultados demonstraram maior eficiência de FBN no tratamento com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, refletida em maiores teores de ureídeos, aminoácidos, abundância de ureídeos e nitrogênio derivado da atmosfera, além de redução de nitrato. *Methylobacterium* apresentou desempenho superior ao controle e à ureia, porém inferior às duas bactérias. No metabolismo antioxidante, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* também se destacaram em todas as variáveis, exceto prolina. O *Methylobacterium* elevou o teor de prolina e, aos 20 DAA, aumentou as atividades de POD e CAT, reduzindo H₂O₂ peroxidação lipídica. A ureia foi o tratamento que menos contribuiu para melhoramento do metabolismo antioxidante das plantas, embora tenha superado o controle em prolina, enzimas antioxidantes e diminuição de H₂O₂. Concluiu-se que a combinação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* apresentou maior eficácia nas respostas avaliadas, seguida de *Methylobacterium symbioticum* e, posteriormente, da ureia.

Palavras-chave: catalase; FBN; *Glycine max*; peroxidase; superóxido dismutase.

Abstract: Soybean is the most widely produced crop in Brazil and holds significant agricultural, economic, and nutritional importance. Due to its high nitrogen demand, this nutrient can be supplied either through nitrogen fertilization or biological nitrogen fixation (BNF). This study aimed to evaluate the influence of *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Methylobacterium*, and urea on biological nitrogen fixation and antioxidant metabolism in soybean plants. The experiment was

conducted in a greenhouse at the Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), located in Patos de Minas, Minas Gerais State, Brazil, on April 11, 2024. Four treatments were evaluated: T1 (control), T2 (urea, 3 kg ha⁻¹), T3 (*Methylobacterium symbioticum*, 330 mL ha⁻¹), and T4 (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*, 2 mL kg⁻¹ seed), with five replications. The soybean cultivar M7601 I2X was used, with applications performed as seed treatment (T4) and at the V4 growth stage (T2 and T3). BNF evaluations were performed 20 days after application (DAA), while antioxidant metabolism analyses were conducted at 5, 11, 14, and 20 DAA at the Plant Physiology and Stress Research Center (UNIPAM). Data were subjected to analysis of variance, and means were compared using Tukey's test at the 5% significance level. The results demonstrated higher BNF efficiency in the treatment with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*, evidenced by increased ureide content, amino acids, ureide abundance, and nitrogen derived from the atmosphere, as well as reduced nitrate levels. *Methylobacterium* showed better performance than the control and urea treatments but was less effective than the combined inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. Regarding antioxidant metabolism, *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* also showed superior performance across all evaluated variables, except for proline. *Methylobacterium* increased proline content and, at 20 DAA, enhanced POD and CAT activities while reducing H₂O₂ content and lipid peroxidation. Urea contributed least to improvements in antioxidant metabolism, although it outperformed the control in proline content, antioxidant enzyme activity, and reduction of H₂O₂. It was concluded that the combination of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* was the most effective treatment, followed by *Methylobacterium symbioticum* and, subsequently, urea.

Keywords: catalase; BNF; *Glycine max*; peroxidase; superoxide dismutase.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merril) é atualmente a cultura mais explorada no Brasil, que se mantém como o maior produtor e exportador mundial dessa leguminosa. Para a safra 2024/25, obteve-se uma produção de 171,47 milhões de toneladas de grãos, valor 13,3% superior ao da safra anterior, em uma área plantada de 47,6 milhões de hectares, representando aumento de 3,2% em relação ao último ano (Conab, 2025). Originária do leste da Ásia, especificamente do nordeste da China, essa oleaginosa da família Fabaceae destaca-se pela ampla importância no mercado agrícola, sendo utilizada tanto na alimentação e nutrição humana e animal quanto na indústria química e na produção de biocombustíveis.

Por apresentar elevado teor proteico nos grãos, a soja demanda altas quantidades de adubação, especialmente de nitrogênio, nutriente essencial ao desenvolvimento, crescimento e reprodução vegetal. Apesar de abundante na Terra, o nitrogênio não se encontra disponível para absorção pelas plantas, visto que sua forma predominante é o gás inerte (N₂). Assim, as plantas podem obtê-lo por três vias principais: absorção de nitrato e amônio; fixação biológica de nitrogênio (FBN); e assimilação de aminoácidos ou moléculas orgânicas presentes no solo (Santos *et al.*, 2021).

Sendo assim, a fixação biológica de nitrogênio ocorre por meio da simbiose entre plantas e bactérias, mas a quantidade desses microrganismos naturalmente presentes no solo não é suficiente para atender à elevada demanda da soja, pois a extração é de 142,9 Kg.ha⁻¹. Dessa forma, torna-se necessária a inoculação, a fim de

ampliar a população bacteriana e garantir maior eficiência no processo simbiótico (Oliveira; Machado, 2021). Nesse contexto, bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, especialmente *Bradyrhizobium japonicum*, são as principais responsáveis pela fixação de nitrogênio na soja. Associada a elas, a coinoculação com *Azospirillum brasiliense* tem se mostrado vantajosa, não apenas pela nodulação e transformação do N₂ atmosférico em NH₃, mas também pela síntese de fitohormônios que favorecem o desenvolvimento radicular (Paiva; Lazaretti, 2022).

Entretanto, a filobactéria *Methylobacterium symbioticum* coloniza folhas guiado pelo metanol liberado pelas plantas, aderindo à superfície com pili e formando biofilmes que protegem contra estresses e criam zonas microaeróbias. A bactéria pode entrar pelos estômatos ou tricomas e crescer no apoplasto, utilizando metanol como fonte de energia via enzima XoxF, dependente de lantanídeos — uma estratégia eficiente em ambientes pobres em carbono (Sohrabi *et al.*, 2023; Deng *et al.*, 2018). Algumas linhagens também utilizam luz por fototrofia anoxigênica aeróbia (AAP), otimizando o uso de C₁. Nessas condições, podem fixar nitrogênio (via nitrogenase) quando há energia e pouco oxigênio, com parte da amônia possivelmente sendo transferida à planta. Ensaios mostram que os efeitos agronômicos são variáveis e contextuais, exigindo validação experimental cuidadosa (Zervas *et al.*, 2019; George *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2024; Arrobas *et al.*, 2024).

O nitrogênio (N) desempenha papel fundamental no desenvolvimento e na produtividade da cultura da soja, especialmente nos estádios reprodutivos, quando a demanda pelo nutriente é elevada. Embora a fixação biológica do nitrogênio (FBN), realizada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium spp.*, seja a principal fonte de N para a soja, diversos estudos demonstram que, em determinadas condições edafoclimáticas, essa fonte pode ser insuficiente para suprir a exigência da planta, comprometendo o rendimento final. A aplicação foliar de ureia pode ser benéfica quando manejada corretamente, reduzindo perdas por volatilização e favorecendo a absorção pela planta. No entanto, a resposta à adubação nitrogenada suplementar ainda é controversa, pois fatores como clima, tipo de solo e manejo influenciam diretamente a eficácia da prática (Marcon *et al.*, 2017). Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Methylobacterium* e ureia na fixação biológica de nitrogênio e no metabolismo antioxidante na cultura da soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), localizada em Patos de Minas (MG), 11 de abril de 2024 e terminou no dia 24 de maio de 2024. Segundo a classificação de Köppen e Geiger (1928), o local apresenta clima tropical de savana (Aw), com pluviometria média anual em torno de 1412 mm, sendo a temperatura média anual igual a 21 °C (Oliveira; Maciel; Queiroz, 2014).

Utilizou-se a cultura de soja [*Glycine max* (L.) Merril.], cultivar M7601 I2X, em delineamento em blocos casualizados (DBC), constituído de quatro tratamentos com

cinco repetições (Tabela 1) totalizando 24 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso de 11 dm³; depois de preenchido com Latossolo Vermelho, foram semeadas 10 sementes e, aos 15 dias após a semeadura, realizou-se o desbaste, mantendo-se cinco plantas. As aplicações foram efetuadas conforme o posicionamento de cada tratamento: tratamento de sementes (T₄) e aplicação foliar no estádio V₄ (T₂ e T₃), utilizando pulverizador manual e volume de calda de 200 L ha⁻¹.

Tabela 1: Tratamentos utilizados no experimento “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”.

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Doses
T ₁	Controle	-
T ₂	Ureia	3 kg.ha ⁻¹
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	330 mL.ha ⁻¹
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>	2 mL.kg semente ⁻¹

2.2 AVALIAÇÕES

As avaliações foram feitas no dia 24 de maio de 2024 no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP), localizado no Campus I do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Foram realizadas as análises de fixação biológica de nitrogênio e do metabolismo antioxidante.

2.3 ANÁLISES DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

As avaliações de fixação biológica de nitrogênio foram realizadas aos 20 dias após a aplicação. Foram determinadas as variáveis: N-Ureídeos (Young e Conway, 1942), N-Aminoácidos (Yemm *et al.*, 1955) com adaptação descrita por Herridge (1984), Nitrato [N-NO₃⁻] (Cataldo *et al.*, 1975), Abundância de ureídeos e Nitrogênio derivado da atmosfera, obtidos a partir de fórmulas que utilizam resultados de ureídeos e nitrato.

2.4 METABOLISMO ANTIOXIDANTE

Análises de marcadores bioquímicos foram realizadas nos dias 5, 11, 14 e 20 dias após a aplicação foliares dos produtos. Foram determinadas as variáveis: Proteína Solúvel Total (Bradford, 1976), Peroxidase (Teisseire; Guy, 2000), Superóxido Dismutase (Beauchamp; Fridovich, 1971 *apud* Bor; Ozdemir; Turkan, 2003), Catalase (Peixoto *et al.*, 1999), Peroxidação lipídica (Heath; Packer, 1968), Peróxido de hidrogênio (Alexieva *et al.*, 2001) e Prolina (Bates *et al.*, 1973).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, pelo programa do SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

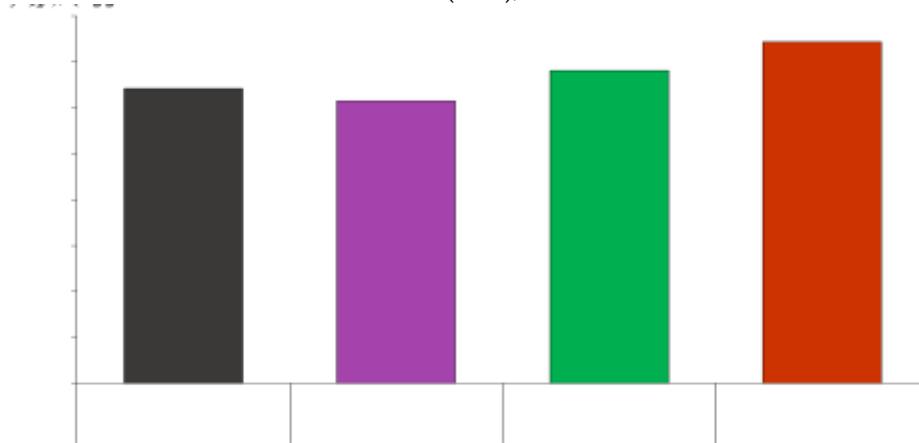
3.1.1 Ureídeos

A análise de ureídeos revelou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figura 1). O tratamento com coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* apresentou incremento de 15,8% em comparação ao controle, evidenciando maior eficiência na assimilação e transporte do nitrogênio fixado. A aplicação foliar de *Methylobacterium symbioticum* também promoveu aumento, embora mais discreto (6%), enquanto o tratamento com ureia não diferiu estatisticamente do controle.

Os ureídeos são formados a partir da amônia e servem como transporte e armazenamento de nitrogênio que foi fixado pelas bactérias nas raízes das plantas. Esses resultados corroboram achados de Omar (2023), que reportou maiores concentrações de ureídeos em feijão-caupi submetido à aplicação de *Azospirillum* em relação ao uso exclusivo de *Bradyrhizobium*, destacando a relevância das bactérias promotoras de crescimento no metabolismo do nitrogênio.

Figura 1: Ureídeos no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de

Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

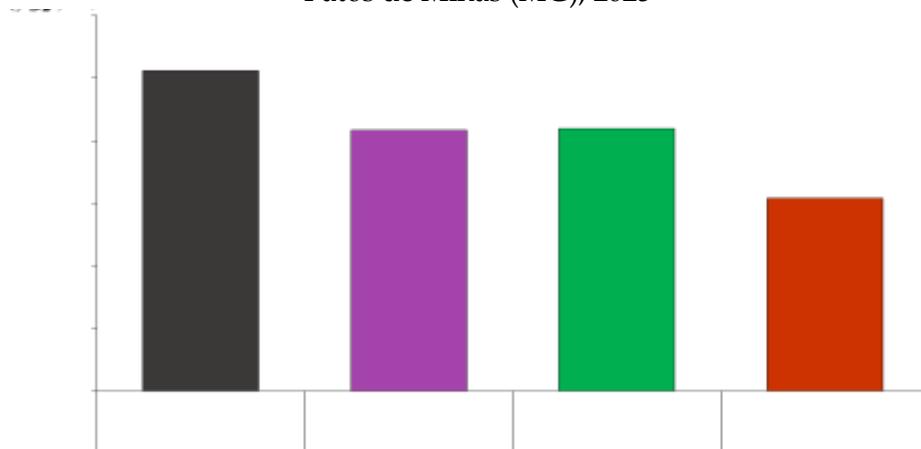
3.1.2 Nitrato

Na Figura 2, observa-se que os resultados apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos. O controle destacou-se por apresentar a maior atividade de nitrato redutase, enquanto os demais tratamentos registraram uma redução média de 25,5%.

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é convertido em formas utilizáveis pelas plantas, como amônia (NH_3) e nitrato (NO_3^-), por meio da ação de microrganismos. O nitrato é uma das formas de nitrogênio absorvido pelas plantas, junto com o amônio (NH_4^+). Após ser absorvido pelas raízes, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO_2^-) e depois a amônia (NH_3) dentro da planta, principalmente nas folhas. A amônia, então, entra na síntese de aminoácidos como a glutamina e glutamato, usados para formar proteínas e enzimas (Embrapa, 2022).

Figura 2: Nitrato no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

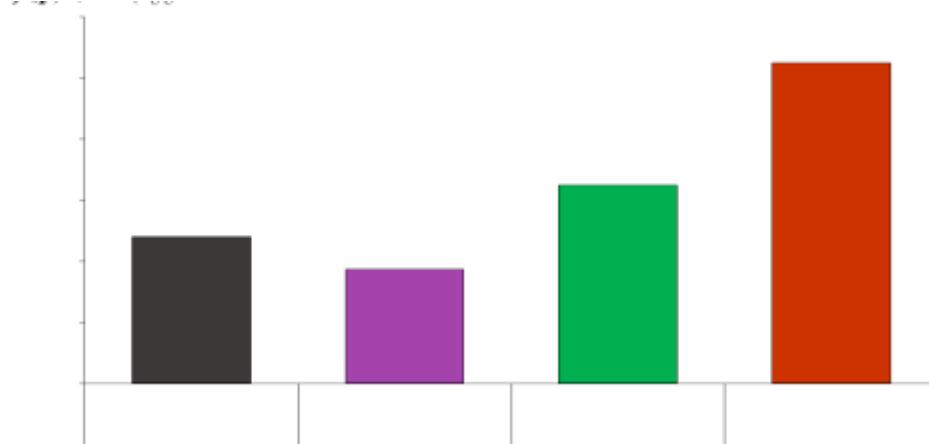
3.1.3 Aminoácidos

Os resultados apresentados na Figura 3 evidenciam incremento expressivo na síntese de aminoácidos totais nos tratamentos com microrganismos. A inoculação com *Bradyrhizobium* e a coinoculação com *Azospirillum* resultaram em aumento de 118,9% em relação ao controle, seguido pelo *M. symbioticum* (+35,5%). Em contraste, a aplicação de ureia reduziu em 22% a concentração de aminoácidos quando comparada ao controle.

Na fixação biológica de nitrogênio, o nitrogênio atmosférico (N_2) é convertido em amônia (NH_3) pela enzima nitrogenase, presente em bactérias fixadoras de nitrogênio. Essa amônia é então incorporada em aminoácidos. Esses resultados indicam que a presença das bactérias favoreceu a incorporação do nitrogênio fixado em compostos orgânicos, como glutamina e asparagina, principais moléculas de transporte de N nas plantas (Fagan *et al.*, 2022). A redução promovida pela ureia pode estar

associada ao desbalanço metabólico provocado pela alta disponibilidade imediata de N mineral, que não necessariamente se converte em formas assimiláveis de aminoácidos.

Figura 3: Aminoácido no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).
Patos de Minas (MG), 2025



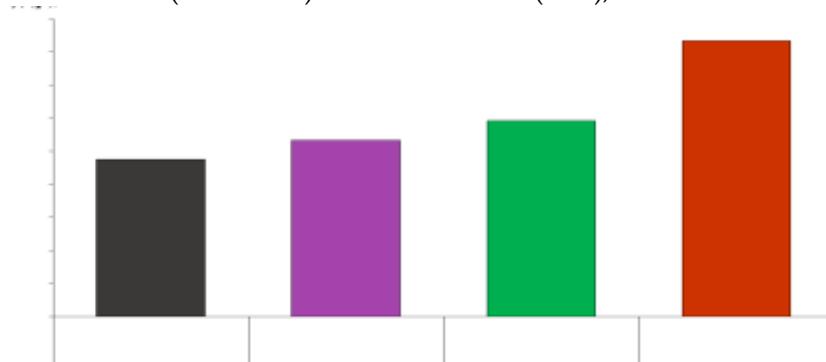
*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.1.4 Abundância de ureídeos

A abundância relativa de ureídeos (RUR%) também apresentou diferenças relevantes (Figura 4). O tratamento com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* elevou em 75,7% os teores em comparação ao controle, enquanto ureia e *M. symbioticum* não diferiram estatisticamente, embora tenham mostrado incremento médio de 18,6%.

A RUR é a abundância de nitrogênio que está presente nas plantas em porcentagem, em relação às demais formas de nitrogênio que são transportados e armazenados. Essa variável indica não apenas o nitrogênio transportado, mas também a proporção de N assimilado e redistribuído pela planta, reforçando a importância da coinoculação para aumentar a eficiência de uso desse nutriente (Delbon, 2023).

Figura 4: Abundância de ureídeos no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



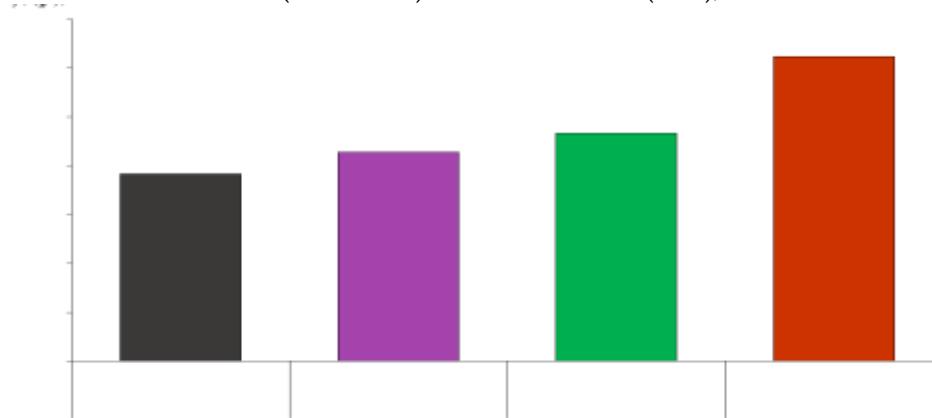
*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.1.5 Nitrogênio derivado da atmosfera

A análise do nitrogênio derivado da atmosfera (Ndfa%) evidenciou incremento de 62,7% no tratamento com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* (Figura 5), confirmando a relevância da fixação biológica como principal fonte de N para a cultura. Já ureia e *M. symbioticum* não diferiram estatisticamente do controle, ainda que tenham proporcionado uma tendência de acréscimo médio de 16,8%. Esse resultado demonstra que, embora fertilizantes e outros microrganismos possam contribuir, a simbiose clássica entre rizóbios e leguminosas permanece insubstituível como fonte primária de N para a soja, especialmente em condições de baixo aporte de nitrogênio mineral (Delbon, 2023).

A análise de Ndfa é essencial para quantificar a fração do nitrogênio que efetivamente provém da FBN e não da solução do solo. Assim, os resultados confirmam que a coinoculação potencializa a contribuição para a FBN, reduzindo a dependência de fontes externas de N. Esse efeito é consistente com estudos que apontam a coinoculação como uma estratégia eficiente para maximizar a fixação e o aproveitamento do N atmosférico em leguminosas (Paiva; Lazaretti, 2022).

Figura 5: Nitrogênio derivado da atmosfera no ensaio intitulado: “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025.



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2 METABOLISMO ANTIOXIDANTE

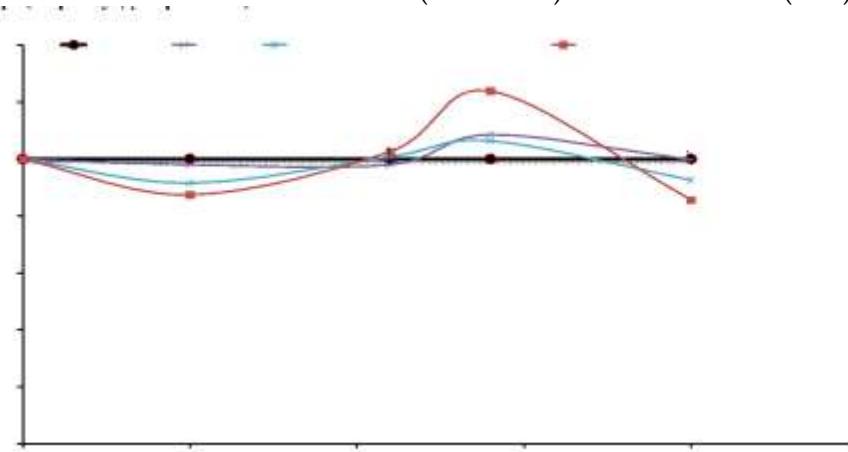
3.2.1 Proteína solúvel total

Na Figura 6 e Tabela 2, observa-se que aos 5, 11 e 20 dias após a aplicação (DAA) não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, mantendo-se valores próximos ao controle. Entretanto, aos 14 DAA, o tratamento com aplicação em sulco de semeadura contendo *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* apresentou acréscimo de 23% em proteína solúvel, seguido pelos demais tratamentos, com aumento médio de 7%.

Esse resultado sugere que a coinoculação estimulou o metabolismo proteico da soja em um momento crítico de desenvolvimento, possivelmente devido à maior disponibilidade de nitrogênio assimilável, o que reflete em incremento na síntese de proteínas estruturais e enzimáticas. Estudos anteriores relatam que bactérias fixadoras de N não afetam diretamente o teor total de proteínas em todas as fases, mas podem promover aumento pontual, especialmente quando o aporte de fertilizantes é limitado (Omar, 2023).

Figura 6: Teores de Proteína Solúvel Total (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

Tabela 2 - Teores de Proteína Solúvel Total (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Proteína solúvel total			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	9,926 ns*	9,824 ns*	8,571 b*	12,362 ns*
T ₂	Ureia	9,723	9,619	9,302 ab	12,314
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	9,088	9,891	9,119 ab	11,436
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i>	e 8,678	10,073	10,618 a	10,577
CV (%):		16.57	10.33	11.37	11.14

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

3.2.2 Peroxidase (POD)

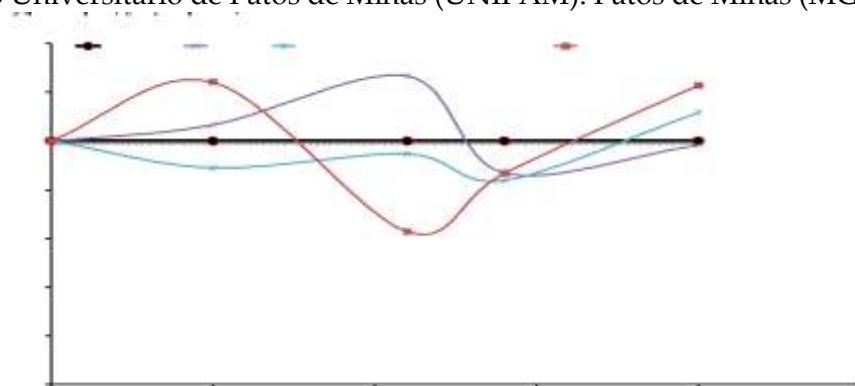
A atividade da enzima peroxidase (Figura 7; Tabela 3) apresentou variação ao longo do ciclo. Aos 5 DAA, o tratamento com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* obteve incremento de 24% em relação ao controle, seguido pela ureia (+6%). Aos 11 DAA, entretanto, a ureia se destacou, com aumento de 26%, enquanto os demais tratamentos reduziram a atividade enzimática. Aos 14 DAA não houve diferenças estatísticas, mas verificou-se tendência de redução em todos os tratamentos. Já aos 20 DAA, os destaques

foram *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* (+22%) e *M. symbioticum* (+11%), enquanto a ureia reduziu os níveis de POD em relação ao controle.

As peroxidases atuam na decomposição do H₂O₂ em água e oxigênio, desempenhando papel central no sistema antioxidante vegetal (Fagan *et al.*, 2025). A resposta variável sugere que a coinoculação proporciona efeito mais consistente ao longo do tempo, enquanto a ureia provoca respostas pontuais. Resultados semelhantes foram relatados por Barros *et al.* (2022), que observaram aumento da atividade de POD em soja tratada com *Bradyrhizobium japonicum* no estádio V₃ e V₆. Contudo, resultados obtidos por Nonato 2016 sobre tratamento de sementes de soja com *Azospirillum* reduziu a atividade da enzima peroxidase em relação ao controle.

Figura 7: Atividade da enzima peroxidase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

Tabela 3: Atividade da enzima peroxidase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Peroxidase			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	2,723 b*	1,140 ab*	2,179 ns*	0,735 b*
T ₂	Ureia	2,900 ab	1,443 a	1,889	0,723 b
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	2,420 b	1,080 b	1,824	0,822 ab
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i>	e 3,383 a	0,716 c	1,890	0,903 a
CV (%):		12.34	17.29	11.48	8.85

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

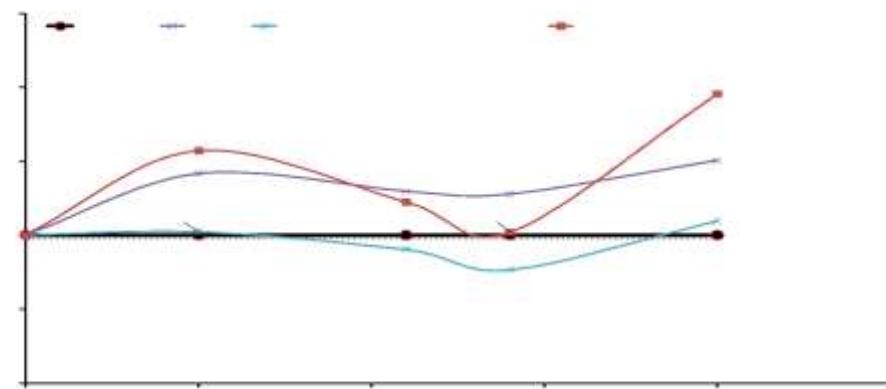
3.2.3 Superóxido dismutase (SOD)

A Figura 8 e a Tabela 4 mostram que, aos 5 DAA, o tratamento com *Bradyrhizobium + Azospirillum* apresentou maior atividade de SOD (+57% em relação ao controle), seguido pela ureia (+41%). O *M. symbioticum* não diferiu do controle nesse estágio inicial. Aos 11 DAA, a ureia (+29%) e a coinoculação (+22%) mantiveram desempenho superior. Aos 14 DAA, a ureia novamente se destacou (+27%), enquanto os demais não diferiram. Finalmente, aos 20 DAA, o melhor resultado foi observado no tratamento com *Bradyrhizobium + Azospirillum*, com expressivo aumento de 95% em relação ao controle, seguido pela ureia (+50%).

A SOD é a primeira linha de defesa antioxidante, promovendo a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 (Fagan *et al.*, 2025). O comportamento observado indica que a coinoculação garante proteção mais robusta em longo prazo, enquanto a ureia gera respostas mais transitórias. Esses resultados corroboram os de Barros *et al.* (2022), que registraram maior atividade da SOD em soja coinoculada com *B. japonicum*. Porém, no trabalho de Nonato (2016), foi utilizado *Azospirillum* e aos 39 dias após o plantio de soja foi reduzida a enzima SOD em relação ao controle.

Figura 8: Atividade da enzima Superóxido Dismutase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 4: Atividade da enzima Superóxido Dismutase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Superóxido Dismutase			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	61,655 c*	58,970 b*	64,347 b*	39,963 c*
T ₂	Ureia	87,338 b	76,503 a	82,154 a	60,141 b
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	63,124 c	53,355 b	49,263 c	43,817 c
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i>	e 96,953 a	72,248 a	65,667 b	78,205 a
CV (%):		7.32	8.90	9.52	10.85

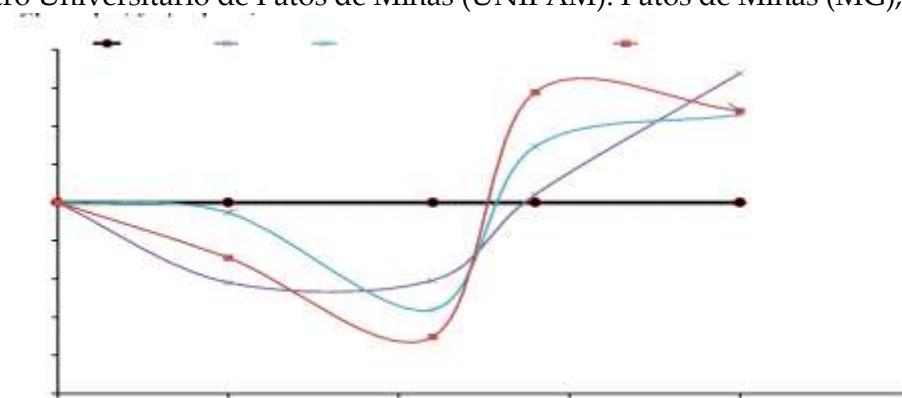
*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2.4 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (Figura 9; Tabela 5) apresentou respostas distintas ao longo do tempo. Aos 5 e 11 DAA, o controle mostrou os maiores valores, enquanto os demais tratamentos apresentaram reduções médias de 46% e 56%, respectivamente. Entretanto, aos 14 DAA, a coinoculação de *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* promoveu aumento expressivo da CAT (+57%), seguida por *M. symbioticum* (+29%). Aos 20 DAA, todos os tratamentos apresentaram incremento em relação ao controle, destacando-se a ureia (+67%), seguida pela coinoculação e *M. symbioticum* (média de +46,5%).

As catalases estão entre as enzimas antioxidantes mais eficientes, degradando o H₂O₂ em curto intervalo de tempo (Fagan *et al.*, 2025). A variação observada sugere que o controle inicial pode estar associado à ausência de estresse oxidativo induzido, mas, em estágios posteriores, a ação dos microrganismos inoculados aumentou a capacidade de resposta antioxidante. Barros *et al.* (2022) relataram que a aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* nos estágios V₃ e V₆ não apresentaram diferença, sendo ainda que foi menor que ao controle.

Figura 9: Atividade da enzima Catalase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Atividade da enzima Catalase (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Catalase			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	155,260 a*	165,018 a*	108,551 c*	59,463 c*
T ₂	Ureia	90,022 b	97,422 b	113,185 c	99,577 a
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	146,886 a	72,350 c	140,472 b	86,846 b
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i>	e	110,352 b	48,960 d	171,150 a
CV (%):		13.80	12.41	11.08	7.37

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2.4 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

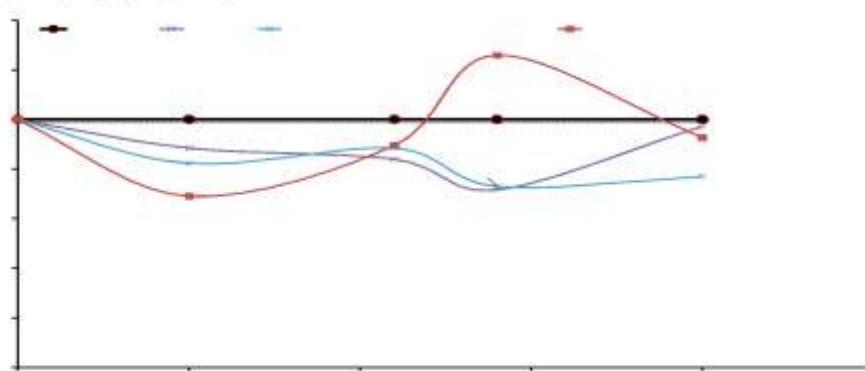
Os teores de H₂O₂ (Figura 10; Tabela 6) também variaram conforme o tempo. Aos 5 DAA, o tratamento com *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* apresentou a maior redução (-32% em relação ao controle), seguido por ureia e *M. symbioticum* (-16%). Aos 11 DAA, não houve diferença significativa, mas todos os tratamentos reduziram em média 13%. Aos 14 DAA, a ureia (-29%) e o *M. symbioticum* (-28%) apresentaram os menores teores, enquanto a coinoculação mostrou tendência de aumento (+25%). Aos 20 DAA, apenas *M. symbioticum* diferiu estatisticamente, com redução de 23%. Esses resultados indicam que a coinoculação é mais eficiente em estágios iniciais, enquanto *M. symbioticum* exerce

efeito tardio, o que está de acordo com estudos que relatam início de ação fisiológica dessa bactéria cerca de 15 a 20 dias após aplicação (Vera *et al.*, 2023).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma forma de ERO que, ao atravessar membranas celulares, forma radicais hidroxila (OH^-), que é o oxidante mais reativo da ERRO (Fagan *et al.*, 2025). O experimento de Barros *et al.* (2022) obteve resultados semelhantes ao aplicar *Bradyrhizobium japonicum* na análise feita no estádio V₃.

Figura 10: Teor de Peróxido de Hidrogênio (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

Tabela 6: Teor de Peróxido de Hidrogênio (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025.

Tratamentos	Descrição	Peróxido de Hidrogênio			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	13,801 b*	18,263 ns*	11,304 c*	15,505 b*
T ₂	Ureia	12,206 ab	15,330	8,102 a	15,067 b
T ₃	<i>Methylbacterium symbioticum</i>	11,362 ab	16,164	8,230 b	11,941 a
T ₄	<i>Bradyrhizobium Azospirillum</i>	e 9,519 a	16,358	14,228 c	14,368 b
CV (%):		16.97	10.97	10.80	7.32

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

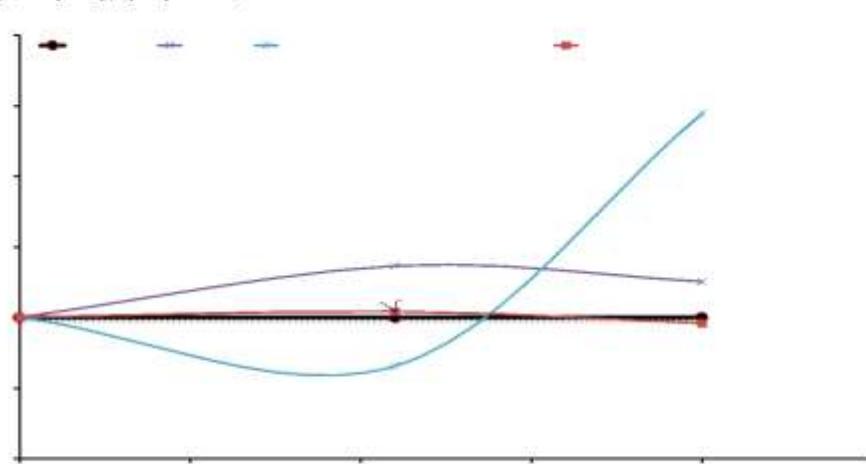
3.2.5 Prolina

Na Figura 11 e Tabela 7, verifica-se que, aos 11 DAA, o tratamento com ureia apresentou maior acúmulo de prolina (+36%), enquanto a coinoculação não diferiu do controle. Já o *M. symbioticum* reduziu em 45% os níveis de prolina nesse período. Entretanto, aos 20 DAA, esse último se destacou com incremento de 144% em relação ao controle. A prolina atua como osmoprotetor, antioxidante não enzimático e sinalizador metabólico, estabilizando membranas e enzimas sob estresse oxidativo (Fagan *et al.*, 2025). Os resultados sugerem que a ureia promoveu efeito imediato, enquanto *M. symbioticum* exerceu ação mais prolongada, refletindo seu modo de colonização e adaptação.

De acordo com Barros *et al.* (2022), o ensaio realizado com *Bradyrhizobium japonicum* apresentou maiores teores de prolina do que o controle, na análise realizada no estádio V₃. Os autores ressaltaram também que os resultados de todas as coletas realizadas indicam que a aplicação de *Azospirillum brasiliense* em doses altas coinoculado com *Bradyrhizobium japonicum* poderia melhorar a proteção contra estresses.

Figura 11 - Teor de Prolina (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro

Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7: Teor de Prolina (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025

Tratamentos	Descrição	Prolina	
		11	20
		Dias após a aplicação	
T ₁	Controle	1,06 b*	0,33 b*
T ₂	Ureia	1,44 a	0,41 b
T ₃	<i>Methyllobacterium symbioticum</i>	0,69 c	0,79 a
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>	1,10 b	0,31 b
CV (%):		18,85	24,11

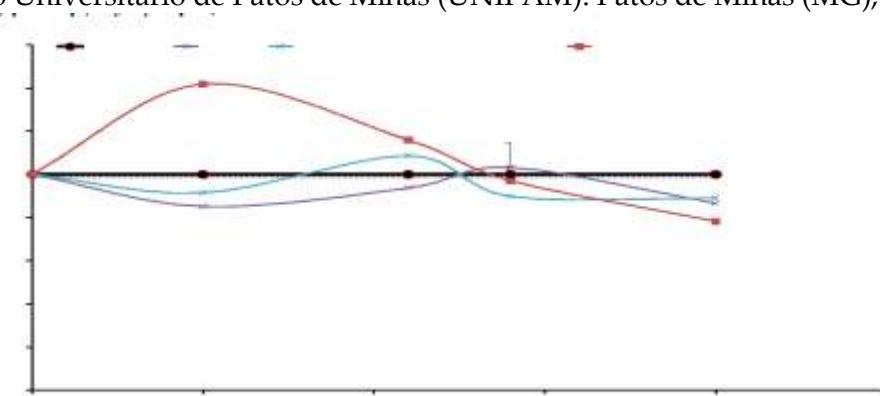
*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2.6. Peroxidação lipídica (PL)

A peroxidação lipídica (Figura 12; Tabela 8) apresentou redução significativa nos tratamentos em estágios finais. Aos 5 DAA, a coinoculação exibiu valores elevados de PL, indicando maior degradação de membranas nesse momento inicial. Aos 11 DAA, não houve diferenças significativas, embora a ureia tenha apresentado menor degradação em comparação ao controle. Aos 14 DAA, *M. symbioticum* foi o destaque, reduzindo em 11% os valores. Finalmente, aos 20 DAA, todos os tratamentos reduziram a peroxidação, sendo mais expressivos *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* (-22%), ureia (-14%) e *M. symbioticum* (-12%).

A PL está associada ao estresse oxidativo e à degradação de membranas celulares. A redução observada em estágios finais indica que tanto os microrganismos inoculados quanto a ureia contribuíram para a mitigação do estresse oxidativo, melhorando a estabilidade das membranas. Esses resultados divergem parcialmente de Barros *et al.* (2022), que não observaram diferenças significativas na PL com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum* no estádio V₃, sugerindo que a resposta pode variar conforme o estádio fenológico da soja. Os resultados são semelhantes aos de Nonato (2016), pois ocorreu redução da PL ao aplicar *Azospirillum* em tratamento de semente em soja.

Figura 12: Teor de Peroxidação Lipídica (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP). Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas (MG), 2025



*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

Tabela 8: Teor de Peroxidação Lipídica (% em relação ao controle) em plantas de soja no ensaio “Interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e nutrição nitrogenada na cultura da soja”. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP).

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Patos de Minas, MG. 2025.

Tratamento	Descrição	Peroxidação lipídica			
		5	11	14	20
Dias após a aplicação					
T ₁	Controle	48,511 a*	62,161 ns*	33,617 ab*	75,250 b*
T ₂	Ureia	41,263 a	58,249	34,697 b	65,022 a
T ₃	<i>Methylobacterium symbioticum</i>	44,386 a	67,551	30,197 a	66,927 a
T ₄	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i>	e 68,810 b	72,033	32,605 ab	58,868 a
CV (%):		9.26	20.95	7.28	7.42

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferenciam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*ns: não significativo.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, no experimento das análises de fixação biológica de nitrogênio e do metabolismo antioxidante, a utilização de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* se destacou. A *Methylobacterium symbioticum* obteve resultados relevantes também, seguida da ureia.

REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, v. 24, p. 1337-1334, 2001.
- ARROBAS, M.; CORREIA, C. M.; RODRIGUES, M. Â. *Methylobacterium symbioticum* applied as a foliar inoculant was little effective in enhancing nitrogen fixation and lettuce dry matter yield. *Sustainability*, v. 16, n. 11, art. 4512, 2024. DOI: 10.3390/su16114512.
- BARROS, F. C.; CAMARGO, R.; LANA, R. M. Q.; FRANCO, M. H. R.; STANGER, M. C.; PEREIRA, V. J.; LEMES, E. M. *Azospirillum brasiliense* and organomineral fertilizer co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* on oxidative stress in soybean. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2022.
- BATES, L.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BOR, M. F.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritime* L. *Plant Science*, Amsterdam, v. 164, p. 77-84, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADEV, L. E.; YOUNGS, V. L.; Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da Safra brasileira de grãos*. v. 12, safra 2024/25, n. 12 - Décimo segundo levantamento. Setembro, 2025.
- DELBON, S. L. O. *Utilização de inoculantes biológicos para fixação de nitrogênio em leguminosas*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Uberlândia. 2023.

INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E NUTRIÇÃO NITROGENADA
NA CULTURA DA SOJA

DENG, Y. W.; RO, S. Y.; ROSENZWEIG, A. C. Structure and function of the lanthanide-dependent methanol dehydrogenase XoxF from the methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1C. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1037–1047, 2018. DOI: 10.1007/s00775-018-1604-2.

EMBRAPA. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Embrapa-Agrobiologia, 2022.

FAGAN, E. B. *et al.* Fisiologia vegetal: fotossíntese, relações hídricas e nutrição mineral. **MyFarm Agro**. v. 1, p. 112-120, 2022.

FAGAN, E. B. *et al.* Fisiologia Vegetal: Mecanismos de defesa e tolerância ao estresse. **MyFarm Agro**. 2025.

GEORGE, D. M.; VINCENT, A. S.; MACKEY, H. R. An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable resource recovery. **Biotechnology Reports**, v. 28, e00563, 2020. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00563.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in **Biochemistry and Biophysics**, New York, v.125, p.189-198, 1968.

MARCON, E. C.; ROMIO, S. C.; MACCARI, V. M.; KLEIN, C.; LÁJUS, C. R. Uso de diferentes fontes de nitrogênio na cultura da soja. **Revista Thema**, v.14, n. 2, p. 298-308, 2017.

NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com *Azospirillum brasiliense* e reguladores vegetais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – PR. Guarapuava (PR), 2016.

OLIVEIRA, L. A.; MACIEL, S. A.; QUEIROZ, L. L. Avaliação do índice padronizado de estiagem pluviométrica (IESP) aplicado ao município de Patos de Minas (MG). **ABCLIMA**, p. 1848-1859, 2014.

OLIVEIRA, L. P.; MACHADO, V. J. Inoculação antecipada e adubação nitrogenada na cultura da soja. **Revista Cerrado Agrociências**, Patos de Minas (MG), v. 12, p. 118-127. 2021.

OMAR, K. **Coinoculação com *Azospirillum brasiliense* e *Bradyrhizobium* sp. aumenta absorção de nitrogênio e produtividade de feijão-caipi, sem alteração na recuperação de nitrogênio do fertilizante**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Ilha Solteira (SP), junho. 2023.

PAIVA, V. J. P.; LAZARETTI, N. S. Inoculação e coinoculação na cultura da soja. **Revista Cultivando o Saber**, p. 85-94. 2022 (Edição Especial).

PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIB, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, A.M. Aluminum effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

RODRIGUES, M. Â.; CORREIA, C. M.; ARROBAS, M. The application of a foliar spray containing *Methylobacterium symbioticum* had a limited effect on crop yield and nitrogen recovery in field and pot-grown maize. **Plants**, v. 13, n. 20, art. 2909, 2024. DOI: 10.3390/plants13202909.

SANTOS, A. H.; COPPETTI, K.; GRAUMANN, A. A.; TRAGNAGO, J. L. Resposta da soja (*Glycine Max L.*) à aplicação de Nitrogênio na forma de ureia em diferentes doses e estágios fenológicos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 1243-1250 jan. 2021.

SOHRABI, R.; PAASCH, B. C.; LIBER, J. A.; HE, S. Y. Phyllosphere microbiome. **Annual Review of Plant Biology**, v. 74, p. 539-568, 2023. DOI: 10.1146/annurev-arplant-102820-032704.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, Amsterdam, v. 153, p. 65-72, 2000. VERA, R. T.; GARCIA, A. J. B.; ÁLVAREZ, F. J. C.; RUIZ, J. M.; MARTIN, F. F. Application and effectiveness of *Methylobacterium symbioticum* as a biological inoculant in maize and strawberry crops. **Folia Microbiologia**, p. 121-131. 2023.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. **The determination of amino-acids with ninhydrin.** 1955. Available in: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1955/an/an9558000209>

YOUNG, E. G.; CONWAY, C. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, 1942.

ZERVAS, A.; ZENG, Y.; MADSEN, A. M.; HANSEN, L. H. Genomics of aerobic photoheterotrophs in wheat phyllosphere reveals divergent evolutionary patterns of photosynthetic genes in *Methylobacterium* spp. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 10, p. 2895-2908, 2019. DOI: 10.1093/gbe/evz204.

ZHU, Y.-G. et al. Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves. **Trends in Plant Science**, v. 28, n. 12, p. 1391-1405, 2023. DOI: 10.1016/j.tplants.2023.05.009.