

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL**



TESE

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA COINOCULADAS COM
DIFERENTES MICRORGANISMOS E SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO EM
CONDIÇÕES DE ELEVADO CO₂**

Eduardo Pereira Shimoia

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S555r Shimoia, Eduardo Pereira

Respostas fisiológicas de plantas de soja coinoculadas com diferentes microrganismos e submetidas ao alagamento em condições de elevado CO₂ [recurso eletrônico] / Eduardo Pereira Shimoia ; Luciano do Amarante, orientador ; Cristiane Jovelina da Silva, Douglas Antônio Posso, Luis Antonio de Ávila, coorientadores. — Pelotas, 2025.

156 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Assimilação de CO₂. 2. Assimilação de nitrogênio. 3. Bactérias diazotróficas. 4. Fungos micorrízicos. 5. Hipóxia. I. Amarante, Luciano do, orient. II. Silva, Cristiane Jovelina da, coorient. III. Posso, Douglas Antônio, coorient. IV. Ávila, Luis Antonio de, coorient. V. Título.

CDD 633.34917

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Eduardo Pereira Shimoia

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA COINOCULADAS COM
DIFERENTES MICRORGANISMOS E SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO EM
CONDIÇÕES DE ELEVADO CO₂**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Fisiologia Vegetal da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial para à obtenção do
título de Doutor em Fisiologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Coorientadores: Dra. Cristiane Jovelina da Silva

Dr. Douglas Antônio Posso

Dr. Luis Antonio de Ávila

Pelotas, 2025

Eduardo Pereira Shimoia

Respostas fisiológicas de plantas de soja coinoculadas com diferentes microorganismos e submetidas ao alagamento em condições de elevado CO_2

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em fisiologia vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Data da Defesa da Tese: 30/05/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano do Amarante (Orientador)

Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas

Dr^a. Ana Claudia Barneche de Oliveira

Doutora em Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Junior Borella

Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Pereira Passaglia

Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Nogueira do Amaral

Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua infinita graça, por iluminar meu caminho com sabedoria, me fortalecer nos momentos de cansaço, me conceder perseverança e saúde para concluir esta etapa tão importante da minha vida.

A minha amada família, expresso minha mais profunda gratidão. Obrigado por cada gesto de apoio, por cada palavra de encorajamento e, sobretudo, por estarem ao meu lado com amor incondicional em todos os momentos desta jornada. Sem a paciência, compreensão, força, conselhos e sacrifícios de vocês, este trabalho não teria sido possível. Esta conquista é tão minha quanto de vocês. Eva Celeste Marques Pereira, Eudo Francisco Shimoia e Eduarda Pereira Shimoia.

À minha namorada, minha parceira de todas as horas, agradeço pelo amor, paciência e apoio inabalável durante toda esta caminhada. Sua presença foi meu alívio nos momentos difíceis, sua confiança foi um incentivo constante e sua compreensão nos momentos de ausência foram a força para seguir em frente. Esta conquista também é reflexo do que construímos juntos. Nathalia Dalla Corte Bernardi.

Aos meus professores, minha mais sincera gratidão. Cada um, à sua maneira, contribuiu de forma única para minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço não apenas pelo conhecimento transmitido, mas pela dedicação, pela paciência e pelo exemplo de compromisso com o ensino. Suas orientações, críticas construtivas e palavras de incentivo foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios desta caminhada. Levarei comigo não só os conteúdos aprendidos, mas também os valores e inspirações que cada um deixou em meu percurso. Em especial aos professores Gustavo Maia, Eugênia Bolacel, Valmor Bianchi e Sidinei Deuner.

Agradeço imensamente às pessoas que generosamente emprestaram seus equipamentos e reagentes, permitindo que eu completasse esta etapa tão importante. Sem o seu apoio, muitos dos desafios práticos desta jornada não teriam sido superados. Sou profundamente grato pela confiança e colaboração. Em especial aos professores Dirceu Agostineto e Ana Claudia Barneche.

Aos colegas que estiveram ao meu lado nesta jornada, agradeço pela parceria, pelas trocas de conhecimento e pelo companheirismo que tornaram esse caminho mais leve e enriquecedor.

Aos amigos que a vida acadêmica me deu durante o doutorado, minha mais sincera e carinhosa gratidão. Compartilhar essa intensa jornada com vocês tornou os desafios mais suportáveis, os aprendizados mais ricos e as conquistas ainda mais significativas. Foram muitas as conversas, risadas, trocas de ideias e apoio mútuo nos momentos de cansaço e incerteza. Cada um de vocês marcou profundamente essa etapa da minha vida, e levo comigo não só colegas, mas amizades que quero preservar para sempre. Em especial aos amigos Cristiane Jovelina da Silva e Douglas Antônio Posso.

Aos meus coorientadores, minha gratidão pelo apoio generoso, pelas valiosas

contribuições e pela orientação atenta ao longo desta jornada. Cada sugestão, cada leitura cuidadosa e cada conversa foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. A dedicação e o comprometimento de vocês enriqueceram não apenas este trabalho, mas também minha formação como pesquisador. Foi uma honra contar com sua experiência e parceria ao longo desse caminho. Em especial ao professor Luis Ávila.

Agradeço, com grande respeito e consideração, aos membros da banca examinadora por gentilmente aceitarem o convite para avaliar este trabalho. Suas contribuições, críticas construtivas e reflexões foram de enorme valor, enriquecendo não apenas esta tese, mas também minha formação acadêmica. Sinto-me honrado pela atenção e seriedade com que dedicaram seu tempo e conhecimento à análise deste estudo.

Por fim mas não menos importante, como de costume em trabalhos científicos, agradeço de forma especial ao meu orientador, Luciano do Amarante, por sua orientação excepcional, paciência, persistência, dedicação e sacrifícios ao longo de toda esta jornada. Sua expertise, visão crítica e apoio constante foram fundamentais para que eu pudesse atingir este objetivo. A sua confiança em meu trabalho e os desafios que me propôs contribuíram imensamente para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Sou profundamente grato por ter tido a oportunidade de aprender sob sua orientação, e este trabalho é, em grande parte, reflexo de suas valiosas contribuições.

RESUMO

SHIMOIA, Pereira Eduardo. **Respostas fisiológicas de plantas de soja coinoculadas com diferentes microorganismos e submetidas ao alagamento em condições de elevado CO₂**. Tese 150p. – Programa de Pós-Graduação Em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

O aumento do CO₂ atmosférico tem motivado pesquisas sobre seus impactos na vida terrestre, com projeções indicando que os níveis atuais (419 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) podem dobrar até o fim do século. Simultaneamente, cresce a área sujeita a alagamentos por irregularidades nas chuvas, com cerca de 17 milhões de km² vulneráveis. O Brasil, maior produtor mundial de soja, depende da inoculação com bactérias diazotróficas para altos rendimentos. No Rio Grande do Sul, quarto maior produtor do país, a soja é cultivada em rotação com arroz irrigado, em áreas com histórico de alagamentos. Embora o aumento de CO₂ beneficie o metabolismo de carbono e nitrogênio em plantas C3, como a soja, o alagamento reduz fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio por *Bradyrhizobium*. A coinoculação com *Rhizophagus intraradices* e *Azospirillum brasilense* destaca-se por mitigar estresses abióticos e melhorar o desempenho metabólico das plantas. Nesse contexto, é essencial investigar os efeitos combinados do aumento do CO₂ atmosférico e do alagamento radicular, considerando também a influência da coinoculação na resposta fisiológica da soja a essas condições. Assim, este trabalho teve como objetivo elucidar adaptações no metabolismo do carbono e nitrogênio em plantas de soja coinoculadas com *Bradyrhizobium elkanii*, *Azospirillum brasilense* e *Rhizophagus intraradices*, cultivadas sob enriquecimento de CO₂ e submetidas ao alagamento. Para isso, plantas de soja foram expostas a elevado CO₂ (750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e alagamento. No primeiro capítulo, plantas de soja foram cultivadas em vasos com solo, em câmaras de topo aberto com CO₂ ambiente (a[CO₂], 420 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevado (e[CO₂], 750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). No estágio V5, foram submetidas a sete dias de alagamento seguidos por quatro dias de drenagem. Avaliaram-se as enzimas fermentativas (álcool desidrogenase e lactato desidrogenase), antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase) e parâmetros biométricos, como massa seca da parte aérea e raízes. A coinoculação sob e[CO₂] atenuou os efeitos do alagamento. Notavelmente, plantas inoculadas apenas com *B. elkanii* sob e[CO₂] mostraram desempenho semelhante às coinoculadas sob a[CO₂], indicando que a coinoculação reduz o estresse por alagamento com respostas fisiológicas comparáveis às de plantas sob e[CO₂]. No segundo capítulo, em condições similares, foram avaliadas as trocas gasosas foliares, glicolato oxidase, glutamina sintetase, glutamato sintase e características biométricas. O e[CO₂] aumentou significativamente as trocas gasosas, principalmente em plantas coinoculadas com *Azospirillum* (CA). De modo geral, o e[CO₂] melhorou a fotossíntese e suprimiu a fotorrespiração, enquanto o CA mitigou o estresse fotorrespiratório causado pelo alagamento e preservou o metabolismo do nitrogênio. Os resultados mostram que a coinoculação com *Azospirillum* sob e[CO₂] aumenta sinergicamente a resiliência da soja ao alagamento, configurando uma estratégia sustentável para a agricultura. Por fim, no terceiro capítulo, avaliou-se a coinoculação foliar de *Azospirillum* em plantas de soja inoculadas inicialmente com *Bradyrhizobium*. Usando as mesmas variáveis do capítulo dois, foi possível verificar uma alta eficiência da coinoculação foliar de *Azospirillum*. Em condições normais de CO₂, a coinoculação foliar é uma mais uma alternativa de coinoculação que resulta na mitigação dos efeitos deletérios do alagamento. Conclui-se que a coinoculação com *Azospirillum* ou *Rhizophagus* é uma estratégia promissora para aumentar a tolerância da soja ao alagamento, especialmente em cenários de mudanças climáticas e CO₂ elevado. Os resultados contribuem para o melhoramento de cultivares tolerantes e o avanço das técnicas de coinoculação em soja.

Palavras-chave: Assimilação de CO₂, assimilação de nitrogênio, bactérias diazotróficas, fungos micorrízicos, *Glycine max* (L) Merrill, hipóxia.

ABSTRACT

SHIMOIA, Pereira Eduardo. **Physiological responses of soybean plants coinoculated with different microorganisms and applied to flooding under high CO₂ conditions.** These 150p. – Postgraduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

The increase in atmospheric CO₂ has prompted extensive research into its impacts on terrestrial life, with projections indicating that current levels (419 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) may double by the end of the century. Simultaneously, the area affected by flooding due to irregular rainfall is expanding, with approximately 17 million km² considered vulnerable. Brazil, the world's largest soybean producer, relies heavily on inoculation with diazotrophic bacteria to achieve high yields. In Rio Grande do Sul, the country's fourth largest soybean-producing state, cultivation often occurs in rotation with irrigated rice, in areas with a history of flooding. Although elevated CO₂ benefits carbon and nitrogen metabolism in C₃ plants such as soybean, flooding impairs photosynthesis and biological nitrogen fixation by *Bradyrhizobium*. Coinoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* has emerged as a promising strategy to mitigate abiotic stresses and enhance the metabolic performance of plants. In this context, it is essential to investigate the combined effects of elevated atmospheric CO₂ and root-zone flooding, also considering the influence of coinoculation on the physiological response of soybean under these conditions. Therefore, the objective of this study was to elucidate the carbon and nitrogen metabolic adaptations in soybean plants coinoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Azospirillum brasilense*, and *Rhizophagus intraradices*, grown under elevated CO₂ and subjected to flooding. To this end, soybean plants were exposed to high CO₂ levels (750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and flooding. In the first chapter, plants were grown in pots filled with soil, inside open-top chambers under ambient CO₂ (a[CO₂], 420 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated CO₂ (e[CO₂], 750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). At the V5 stage, plants were subjected to seven days of flooding followed by four days of drainage. Fermentative (alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase) and antioxidant (superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase) enzyme activities, as well as biometric parameters such as shoot and root dry mass, were evaluated. Coinoculation under e[CO₂] attenuated the negative effects of flooding. Notably, plants inoculated only with *B. elkanii* under e[CO₂] showed similar performance to coinoculated plants under a[CO₂], indicating that coinoculation alleviates flood-induced stress, yielding physiological responses comparable to those of plants grown under e[CO₂]. In the second chapter, under similar conditions, foliar gas exchange, glycolate oxidase, glutamine synthetase, glutamate synthase, and biometric characteristics were assessed. Elevated CO₂ significantly enhanced gas exchange, especially in plants coinoculated with *Azospirillum* (CA). Overall, e[CO₂] improved photosynthesis and suppressed photorespiration, while CA mitigated photorespiratory stress caused by flooding and preserved nitrogen metabolism. The results demonstrate that coinoculation with *Azospirillum* under e[CO₂] synergistically enhances soybean resilience to flooding, offering a sustainable strategy for agriculture. Finally, in the third chapter, foliar coinoculation with *Azospirillum* was evaluated in soybean plants initially inoculated with *Bradyrhizobium*. Using the same variables as in Chapter 2, high efficiency of foliar coinoculation with *Azospirillum* was observed. Under normal CO₂ conditions, foliar coinoculation emerged as an alternative approach that effectively mitigates the harmful effects of flooding. In conclusion, coinoculation with *Azospirillum* or *Rhizophagus* is a promising strategy to increase soybean tolerance to flooding, particularly in the context of climate change and elevated CO₂. These findings contribute to the development of stress-tolerant cultivars and the advancement of coinoculation techniques in soybean cultivation.

Keywords: CO₂ assimilation, diazotrophic bacteria, *Glycine max* (L.) Merrill, hypoxia, mycorrhizal fungi, nitrogen assimilation

LISTA DE ABREVIATURAS

A- Fotossíntese líquida

a[CO₂]- Concentração de dióxido de carbono ambiente 420 $\mu\text{mol mol}^{-1}$

ADH- Álcool desidrogenase

Ala-At- Alanina aminotransferase

APX- Ascorbato peroxidase

CA- Coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum*

CAR- Coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* + *Rhizophagus*

Carot- Carotenóides

CAT- Catalase

Chlo_*a*- Clorofila a

Chlo_*b*- Clorofila b

Ci- Carbono interno

CR- Coinoculação *Bradyrhizobium* + *Rhizophagus*

E- Transpiração

e[CO₂]- Concentração elevada de dióxido de carbono 750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$

Fd-GOGAT- Glutamato sintase

GO- Glicolato oxidase

***g_s*-** Condutância estomática

GS- Glutamina sintetase

IB- Inoculação *Bradyrhizobium*

LDH- Lactato desidrogenase

MDA- Malondialdeído

OTC- Câmaras de topo aberto

PDC- Piruvato descarboxilase

RDW- Massa seca de raízes

SD- Diâmetro de caule

SDW- Massa seca de parte aérea

SEMIA- Seção de microbiologia agrícola

SOD- Superóxido dismutase

UFC- Unidades formadoras de colônia

VR- Volume radicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Elevado CO ₂ (e[CO ₂]).....	12
1.2 Alagamento	16
1.3 Coinoculação (<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azospirillum</i> e <i>Rhizophagus</i>).....	21
2 REFERÊNCIAS.....	27
HIPÓTESE.....	38
OBJETIVO	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
CAPÍTULO I - Co-inoculation of soybean seeds with <i>azospirillum</i> and/or <i>rhizophagus</i> mitigates the deleterious effects of waterlogging in plants under enhanced co₂ concentrations	39
1. Introduction	39
2. Materials and Methods	41
2.1. Plant Material, Growth Conditions, and Treatments	41
2.2. Gas Exchange, Plant Growth, Biomass Accumulation, and Total Chlorophyll Content.....	43
2.3. Hydrogen Peroxide Levels, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Enzyme Activity	43
2.4. Fermentative Enzymes and Ala-AT.....	43
2.5. Total Soluble Sugar Content	44
2.6. Experimental Design and Statistical Analyses.....	44
3. Results	44
3.1. Effect of e[CO ₂] and Co-Inoculation on Gas Exchange and Photosynthetic Pigments.....	44
3.2. Effect of e[CO ₂] and Co-Inoculation on H ₂ O ₂ Production and Lipid Peroxidation	48
3.2.1. H ₂ O ₂ Content and Lipid Peroxidation in Leaves	48
3.2.2. H ₂ O ₂ Content and Lipid Peroxidation in Roots.....	49
3.3. Effect of e[CO ₂] and Co-Inoculation on Antioxidant Enzyme Activity.....	51
3.3.1. Antioxidant Enzyme System in Leaves	51
3.3.2. Antioxidant Enzyme System in Roots	53
3.4. Effect of e[CO ₂] and Co-Inoculation on Fermentative Metabolism	55
3.5. Effect of e[CO ₂] and Co-Inoculation on Biometric Parameters and Total Soluble Sugars.....	57
3.5.1. Biometric Parameters.....	57
3.5.2. Total Soluble Sugars and Root Fresh Weight	59
3.5.3. Principal Component Analysis and Hierarchical Clustering Analysis.....	60

4. Discussion	66
5. Conclusions	70
6. References	71
CAPÍTULO II - Co-inoculation of <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Azospirillum</i> mitigates the deleterious effects of waterlogging in soybean plants in a scenario of enhanced atmospheric CO ₂	
	75
ABSTRACT	75
1. INTRODUCTION.....	76
2. MATERIAL AND METHODS	77
2.1. Plant Material, Growth Conditions, and Treatments	77
2.2. Gas Exchange, Plant Growth, and Biomass Accumulation	81
2.3. Enzyme Activity Assays.....	81
2.3.1 Glycolate Oxidase (GO; EC 1.1.3.1).....	81
2.3.2 Glutamine Synthetase (GS; EC 6.3.1.2)	81
2.3.3 Ferredoxin-Glutamate Synthase (Fd-GOGAT; EC 1.4.1.7)	82
2.4. Experimental Design and Statistical Analysis	82
3. RESULTS.....	83
3.1. Effects of e[CO ₂] and CA on soybean gaseous exchange under waterlogging.....	83
3.2. Effects of e[CO ₂] and CA on soybean photorespiratory metabolism under waterlogging	85
3.3. Effects of e[CO ₂] and CA on soybean biometric variables under waterlogging....	88
3.4. Multivariate Analysis	91
4. DISCUSSION.....	95
5. CONCLUSION	98
Acknowledgements.....	98
Author contributions.....	98
6. REFERENCES.....	99
CAPÍTULO III - Impacto da coinoculação foliar de <i>Azospirillum</i> em plantas de soja associadas simbioticamente com <i>Bradyrhizobium</i> submetidas à condição de alagamento	
	106
RESUMO	106
1. INTRODUÇÃO.....	106
2. METODOLOGIA	109
2.1 Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos.....	109
2.2 Trocas gasosas, crescimento das plantas, acúmulo de biomassa e conteúdo total de clorofila	111
2.3. Análise de enzimas relacionadas à fotorrespiração e metabolismo do nitrogênio	112

2.4 Atividade das enzimas fermentativas e Ala-At	113
2.5 Teores de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX).....	114
2.6 Análise de metabólitos	115
2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	116
3. RESULTADOS	116
3.1 Efeitos do alagamento nas trocas gasosas de plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos.....	117
3.2 Efeitos do alagamento no metabolismo fotorrespiratório e nitrogenado de plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos	119
3.3 Efeitos do alagamento na concentração de pigmentos de plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos.....	122
3.4 Efeitos do alagamento na produção de H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica em plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos	124
3.4.1 H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica em folhas	124
3.4.2 H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica em raízes	125
3.5 Efeitos do alagamento nas enzimas do sistema antioxidante de plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos.....	126
3.5.1 Enzimas do sistema antioxidante em folhas.....	126
3.5.2 Enzimas do sistema antioxidante em raízes	129
3.6 Efeitos do alagamento no metabolismo fermentativo de plantas de soja coinoculadas em diferentes órgãos.....	132
3.7 Efeitos do alagamento na concentração de aminoácidos e ureídeos em plantas de soja coinoculadas em diferentes órgãos	134
3.7.1 Concentração de aminoácidos em folhas e raízes	134
3.7.2 Concentração de Ureídeos em folhas e raízes	136
3.8 Efeitos do alagamento nos parâmetros biométricos de plantas de soja coinoculadas com <i>Azospirillum</i> em diferentes órgãos.....	138
4. DISCUSSÃO	140
5. CONSIDERAÇÕES.....	146
6. REFERÊNCIAS.....	146
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	156

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Elevado CO₂ (e[CO₂])

Atualmente, a população mundial ultrapassa 8 bilhões de pessoas, e projeções indicam que esse número poderá alcançar 9 bilhões em menos de um século (DAS-USA, 2022). Paralelamente a esse crescimento, as mudanças ambientais decorrentes de atividades antrópicas têm se intensificado de forma contínua. Com o aumento populacional, é plausível que tais alterações se tornem ainda mais pronunciadas. Entre as principais transformações ambientais observadas, destaca-se a elevação na concentração de gases atmosféricos, especialmente aqueles relacionados ao efeito estufa, sendo o dióxido de carbono (CO₂) um dos mais relevantes. Desde o início das medições, na década de 1960, quando os níveis de CO₂ estavam abaixo de 320 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, observou-se um aumento constante. Atualmente, a concentração atmosférica de CO₂ já ultrapassa 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, com uma média registrada de 419,68 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ em agosto de 2023, e projeções indicam que esse valor poderá dobrar até o final do século (IPCC, 2023).

O aumento nos níveis de CO₂ atmosférico, por si só, não constitui a maior preocupação da comunidade científica, uma vez que estudos indicam que a elevação dos gases de efeito estufa pode ocorrer de forma cíclica ao longo da história da Terra. O que realmente causa apreensão é a taxa exponencial de liberação desses gases, intensificada por atividades antrópicas. Dados históricos mostram que, com o advento da Revolução Industrial, houve picos significativos na emissão de CO₂, especialmente entre as décadas de 1980 e 1990, quando as taxas de crescimento anual ultrapassaram os 2%. Embora atualmente essa taxa esteja reduzida, situando-se em torno de 0,5%, ela ainda é considerada elevada, sobretudo em função dos altos níveis já acumulados. A principal fonte dessas emissões é, indiscutivelmente, a queima de combustíveis fósseis. Em resposta, têm sido firmados diversos acordos internacionais visando à mitigação das emissões de gases de efeito estufa. As principais estratégias intergovernamentais incluem a adoção de mecanismos como os créditos de carbono e o incentivo à transição energética, com ênfase na utilização de fontes renováveis e mais sustentáveis (IPCC, 2023).

A presença de gases como (dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, ozônio etc) na atmosfera, em si, não representa um problema. Pelo contrário, esses gases desempenham um papel fundamental na manutenção da vida na Terra ao reterem parte do calor irradiado pelo Sol, promovendo o aquecimento do planeta por meio do chamado efeito estufa. No entanto, o desequilíbrio ocorre quando a concentração desses gases ultrapassa os níveis considerados naturais. Embora não impeçam a entrada da radiação solar, esses gases possuem a capacidade

de dificultar a saída da radiação refletida pela superfície terrestre. Esse fenômeno é explicado pelas diferenças no comprimento de onda: a radiação solar, composta por ondas curtas, penetra facilmente a atmosfera, enquanto a radiação emitida pela Terra, de ondas longas, é parcialmente retida pelos gases de efeito estufa, resultando no aumento da temperatura global.

A elevação da temperatura global, resultante do aquecimento da Terra, tem provocado alterações significativas no clima. Essas mudanças climáticas estão diretamente associadas à intensificação de eventos climáticos extremos, como precipitações intensas, ondas de calor atípicas, longos períodos de estiagem, entre outros. Ao modificar a temperatura, impacta-se diretamente o ciclo hidrológico, frequentemente de maneira negativa. Em termos gerais, eventos pluviométricos extremos tendem a gerar consequências catastróficas para a sociedade. Estima-se que aproximadamente 17 milhões de quilômetros quadrados da superfície terrestre estejam vulneráveis a alagamentos (Kaur et al., 2020).

Ao analisar as mudanças climáticas, especialmente a elevação das concentrações atmosféricas de CO₂, sob a perspectiva das plantas, é possível considerar que esse fenômeno pode, em determinadas condições, favorecer seu desempenho fisiológico. Isso ocorre porque o CO₂ é utilizado como fonte primária de carbono no metabolismo vegetal, sendo essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. No entanto, a forma como esse carbono é assimilado varia de acordo com os diferentes tipos de metabolismo fotossintético: C₃, C₄ e CAM. Espécies com metabolismo C₄ apresentam respostas mais modestas ao aumento do CO₂ atmosférico, uma vez que já dispõem de adaptações anatômicas e rotas bioquímicas especializadas que concentram CO₂ nas proximidades do sítio ativo da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), responsável pela fixação do carbono (von Caemmerer et al., 2003; Cummins, 2021).

Nas plantas C₄, as reações dependentes de luz e as reações independentes de luz ocorrem em compartimentos celulares distintos, o que contribui para sua elevada eficiência fotossintética. De modo geral, o CO₂ é inicialmente fixado nas células do mesófilo na forma de bicarbonato (HCO₃⁻), por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). Em seguida, os ácidos orgânicos de quatro carbonos, como o malato, são transportados até as células da bainha do feixe vascular, onde são descarboxilados, liberando CO₂ diretamente na proximidade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), que atua no ciclo de Calvin. Esse arranjo anatômico e bioquímico permite uma concentração interna de CO₂ que minimiza a ocorrência de fotorrespiração, um processo energeticamente dispendioso. Ainda assim, sob condições de elevadas concentrações atmosféricas de CO₂, algumas alterações fisiológicas podem ser observadas em plantas C₄, como a redução no número de

estômatos e na condutância estomática, o que resulta em maior eficiência no uso da água (Faria et al., 2018).

Por outro lado, os efeitos do aumento das concentrações atmosféricas de CO₂ tendem a ser mais expressivos em plantas com metabolismo fotossintético C₃. Isso se deve, em grande parte, à natureza da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), que possui atividade dual: carboxilase e oxigenase. A enzima apresenta maior afinidade pelo CO₂ ($K_m \approx 16 \mu\text{M}$) do que pelo O₂ ($K_m \approx 497 \mu\text{M}$) (Cummins et al., 2021). No entanto, Cummins e colaboradores descrevem que esses valores podem variar entre espécies de plantas C₃. Em condições atmosféricas normais, a concentração de O₂ é aproximadamente 290.000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, enquanto a de CO₂ é de cerca de 419 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, o que acaba neutralizando, em parte, a preferência da RuBisCO pelo CO₂. Assim, estima-se que as concentrações intracelulares desses gases sejam de aproximadamente 263 μM para o O₂ e 190 μM para o CO₂ (Adler et al., 2022).

Durante a fixação do CO₂ no ciclo de Calvin-Benson, a RuBisCO catalisa a formação de 3-fosfoglicerato, um intermediário que pode ser direcionado para o armazenamento de açúcares, transporte ou processos respiratórios (Thomas, 2024). No entanto, quando a RuBisCO utiliza O₂ como substrato, além do 3-fosfoglicerato, é gerado também o 2-fosfoglicolato, um composto que não pode ser imediatamente assimilado no ciclo. Para que esse metabólito entre novamente na via metabólica, é necessária a adição de uma nova molécula de carbono, desencadeando o processo de fotorrespiração — um mecanismo menos eficiente do ponto de vista energético e que representa uma limitação ao rendimento fotossintético (Thomas, 2024).

O processo fotorrespiratório é complexo e extenso, basicamente ele se estende por três organelas, cloroplasto, peroxissomo e mitocôndria (Kuhnert et al., 2021). Alguns pontos importantes da fotorrespiração são a perda de CO₂, o gasto de energia, a formação de espécies reativas de oxigênio e a liberação de amônia (Xu et al., 2015). Algumas enzimas são chave nesse processo, a glicolato oxidase (GO) é responsável por converter o glicolato em glioxilato, nesse processo ocorre a formação de uma molécula de H₂O₂ (Kuhnert et al., 2021); a glutamina sintetase (GS), é responsável pela incorporação de NH₃ no glutamato para formação de glutamina; a 2-oxo-glutarato aminotransferase (GOGAT), realiza a aminação da molécula de α -cetoglutarato utilizando glutamina para formação de glutamato (Ferrario-Mery et al., 2002; Marino et al., 2022). As restrições da fotorrespiração pelo elevado CO₂ ($e[\text{CO}_2]$) podem reduzir os níveis H₂O₂, diminuindo o estresse oxidativo, possivelmente protegendo o aparato fotossintético e membranas dos cloroplastos (Watanabe et al., 2014 ; Zinta et al.,

2014). A função protetora contra a fotoxidação e fotoinibição (Zinta et al., 2014), possivelmente ocorre por meio da regulação positiva da (GS) para reciclar amônia (Kozaki e Takeba, 1996).

Quando espécies de plantas C3, são cultivadas em ambientes de elevado CO₂, ocorre redução do processo fotorrespiratório semelhante ao que ocorre em plantas C4 (Rakhmankulova et al., 2023). As alterações são percebidas de diversas maneiras, as mais comuns são com a ativação do sistema de defesa antioxidante, reduzindo o efeito negativo dos fatores de estresse no metabolismo de açúcares e aminoácidos, um aumento na intensidade de carboxilação da RuBisCo, aumento da fotossíntese (*A*), redução da condutância estomática (*g_s*), aumento no uso e eficiência da água e redução da transpiração (*E*) (Xu et al., 2015; Rakhmankulova et al., 2023). Uma das alterações mais marcantes do efeito do e[CO₂] é a redução da *g_s*, isso aumenta o uso eficiente da água sem afetar negativamente a fotossíntese (Rakhmankulova et al., 2023). Os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos de detecção e resposta ao CO₂ são propriedades intrínsecas das células guarda, que responderem a concentração interna de CO₂ (*C_i*). As concentrações de íons e solutos orgânicos medeiam a pressão de turgescência das células-guarda que determinam a abertura estomática. O fechamento estomático requer que o potencial iônico da membrana da célula guarda seja despolarizado (Ma e Bai et al., 2021). Estudos eletrofisiológicos mostraram que e[CO₂] aumenta a atividade dos canais retificadores de K⁺ para fora, aumenta as atividades dos canais aniônicos tipo S, estimula a liberação de Cl⁻ e aumenta a concentração de Ca²⁺ das células-guarda. (Raschke et al., 2003; Ainsworth et al., 2007). Essas mudanças despolarizam a membrana das células guarda e causam o fechamento estomático, portanto, uma maior despolarização devido ao e[CO₂] resulta em uma abertura estomática reduzida.

As melhorias na fixação de N₂ e nas trocas gasosas em plantas expostas ao e[CO₂], garantem às plantas de soja uma maior taxa de crescimento e rendimento (Rogers et al., 2009; Li et al., 2017; Drag et al., 2020). Contudo, ao mesmo tempo que estamos aumentando as taxas de crescimento, estamos exigindo maior disponibilidade de outros recursos, principalmente água e nutrientes. É possível que plantas cultivadas em ambientes de elevado CO₂, estejam passando por deficiências nutricionais, principalmente de nitrogênio devido ao aumento da demanda para sustentar o crescimento e desenvolvimento. Bloom et al. (2010) descrevem que o e[CO₂] inibe a assimilação de NO³⁻ e reduz o conteúdo de N orgânico das plantas, após o período de aclimação ao e[CO₂]. Porém as leguminosas podem usar o N₂ do ar como fonte para sintetizar compostos orgânicos de N. Então as leguminosas mantêm altas taxas de fotossíntese sob e[CO₂], mesmo após tratamento de longo prazo (Arenque et al.,

2014, Bernacchi et al., 2006). Nesse caso $e[CO_2]$ resulta em aumento da biomassa, que está correlacionada com a capacidade de formar nódulos (Cernusak et al., 2011). O efeito estimulador do $e[CO_2]$ no crescimento pode diluir a qualidade nutricional da soja (Upreti et al., 2010, Wieser et al., 2008). Apesar disso Hao et al., (2016), mostra claramente que o $e[CO_2]$ aumenta a absorção de macronutrientes N, P, K requeridos em maior quantidade pelas plantas. Da mesma forma, Shardendu et al., (2014) relatam que plantas crescidas em $e[CO_2]$ necessitam maiores quantidades de nutrientes, o que é dependente da capacidade do solo em prover os nutrientes às plantas de forma satisfatória.

Dados mostram que bactérias diazotróficas crescidas em um meio de $e[CO_2]$, sustentam toda a demanda de N da planta, porém caso estas mesmas bactérias sejam inoculadas em plantas se desenvolvendo em um ambiente de $a[CO_2]$, a eficiência simbiótica e fixação de N_2 é reduzida (Soba et al., 2021). Isso ocorre devido à maior demanda de carboidratos por parte da bactéria, a qual não é sustentada por plantas cultivadas em $a[CO_2]$ (Palit et al., 2020; Soba et al., 2021). Por fim, plantas de soja respondem com excelência ao $e[CO_2]$, com maior taxas de crescimento sustentada por uma melhor interação planta bactéria. Via de regra as maiores taxas de A são capazes de fornecer concentrações adequadas de açúcares para os nódulos que irão fixar mais N_2 , inclusive em condições de estresse (Aranjuelo et al., 2014; Thomey et al., 2019).

1.2 Alagamento

As plantas buscam se manter metabolicamente em homeostase, procurando que seu crescimento e desenvolvimento seja o mais eficiente possível, porém constantemente elas estão expostas a situações que as fazem sair deste estágio de homeostase (Jorge et al., 2016). Normalmente os agentes causadores de alterações na homeostase das plantas são mudanças ambientais, sejam elas causadas por fatores bióticos ou abióticos. Quando um fator desencadeia alteração na homeostase das plantas nós o denominamos estresse (Jorge et al., 2016). Dentre as condições abióticas mais estudadas estão o déficit hídrico e o alagamento. A cultura da soja, uma das mais importantes para a alimentação e economia mundial (Nair et al., 2023), está sujeita a ambos os estresses (Wang et al., 2020; Vital et al., 2022).

O alagamento é causado principalmente por alterações na dinâmica das precipitações, com elevação nos volumes pluviométricos. Outro fator determinante na ocorrência de alagamentos é o cultivo de plantas em regiões de terras baixas. Nesses ambientes, o solo normalmente possui má drenagem, topografia plana, lençol freático elevado e, geralmente, é caracterizado por um horizonte B textural, o qual garante ao perfil do solo uma péssima capacidade de infiltração de água (Collaku e Harrison, 2002; Jitsuyama, 2017). Ainda, estas

regiões geralmente são próximas de rios, lagoas lagunas e em sua grande maioria apresentam solos hidromórficos (Magalhães et al., 2005). Assim, nestes ambientes, mesmo que não ocorram precipitações intensas as chances de formações de lâminas de água são grandes, expondo as plantas ao alagamento do sistema radicular, e em casos mais extremos, a submersão (Fukão et al., 2019).

No planeta aproximadamente 17 milhões de Km², estão expostos ao alagamento (Kaur et al., 2020). No Brasil, Estima-se que 28 milhões de hectares estão expostos às condições de inundação, destes, aproximadamente 13 milhões de hectares estão localizados no estado do Rio Grande do Sul (RS) (EMBRAPA, 2018). No RS, a maior parte da área cultivada sujeita ao alagamento é utilizada para cultivo de arroz irrigado (957.185 hectares), porém na safra de 2021/2022, a área plantada com soja em rotação com o arroz irrigado foi de 426.212 hectares (DATER, 2022). Dentre os motivos da rotação de culturas arroz/soja no RS estão o melhor controle de pragas, doenças, plantas daninhas e retorno econômico (Sartori et al., 2013; Rocha et al., 2017; Ribas et al., 2021).

O grande problema imposto pelo alagamento tanto em soja quanto em outras culturas é a redução dos níveis de oxigênio (O₂) no solo e nas raízes das plantas, pois o espaço poroso do solo outrora ocupado por ar fica preenchido com água. Conforme o nível de O₂ presente no meio, o ambiente é classificado como hipóxico (>20%) ou então anóxico (> 2%) (Fukão et al., 2019). A redução do nível de O₂ ocorre devido à baixa difusão dos gases em água, cerca de 10.000 vezes menor que no ar (Armstrong et al., 1994). Após a redução dos níveis de O₂ no solo a planta percebe a alteração no ambiente e então desencadeia uma série de alterações fisiológicas afetando a homeostase metabólica, caracterizando o estresse por déficit de O₂ (Ploschuk et al., 2019).

O O₂ é exigido pelas células para realizar o processo respiratório, desempenhando papel fundamental como aceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (CE) (Armstrong e Strange, 1994; António et al., 2016). Devido a isso, as plantas possuem uma família de sensores de O₂ responsivos ao etileno VII (ERF-VII) (Pucciariello et al., 2019). Como a difusão de gases em água é reduzida, essa regra também é válida para o etileno. Ao se acumular nas raízes com o alagamento ele sinaliza diversas vias de respostas ao alagamento como ativação do metabolismo fermentativo, formação de aerênquima, dentre outros mecanismos (Hartman et al., 2019). Com a redução drástica da atividade da CE e produção de ATP, ocorre acúmulo e alterações de intermediários do ciclo do ácido cítrico, levando ao acúmulo de piruvato (van Dogen e Lucausi, 2015; António et al., 2016; Borela et al., 2017). Assim para evitar o acúmulo de piruvato e a parada também da

glicólise e como forma de manter a regeneração de poder redutor, ocorre a ativação do metabolismo fermentativo (Posso et al., 2023).

A atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC), e álcool desidrogenase (ADH) é elevada já nas primeiras horas de alagamento, porém não conseguem manter a produção de ATP (da-Silva e Amarante et al., 2020a, b). A produção de ATP a nível de substrato é muito reduzida (2 ATP) em comparação com a fosforilação oxidativa (36 ATP) (Arminstrong e Strange, 1994; Zabala et al., 2009; van Dogen e Licausi, 2015). Esses autores também descrevem aumentos na atividade da enzima alanina amino transferase (Ala-At), que atua catalisando a interconversão de piruvato e glutamato em 2-oxoglutarato e alanine. Esse acúmulo de alanina pode servir como fonte de aminoácidos durante e após o alagamento (Borella et al., 2017).

Mesmo a ativação do metabolismo fermentativo sendo uma alternativa para as plantas resistirem ao alagamento, com o tempo ocorre o acúmulo de lactato e etanol que são elementos tóxicos para as células (Rocha et al., 2010; da-Silva e Amarante et al., 2020a). O lactato, apesar de tóxico, é exportado para a parte aérea e pode ser convertido em piruvato. Já o etanol pode levar a uma grande perda de carbono devido a sua difusão e volatilização. Dentre os mecanismos responsáveis pela redução na atividade de aquaporinas nas células de raízes está a redução do pH celular, que é ocasionado pelo acúmulo de lactato produzido pela enzima LDH (Maurel et al., 2015). Além do metabolismo fermentativo, também ocorre a formação de aerênquima, que ao se formar disponibiliza O₂ para as raízes que pode ser uma forma de alívio do estresse (Yamauchi et al., 2018). A formação de aerênquima também foi descrita ocorrendo em nódulos de *Bradyrhizobium* em simbiose com plantas de soja, o que pode estar diretamente relacionado com a sobrevivência das bactérias ao estresse (Thomas et al., 2005). A formação de aerênquima pode ser percebida pelo aumento no diâmetro de caule e volume de raízes. Mesmo que durante o alagamento o volume de raízes acabe reduzindo, é perceptível um aumento de raízes adventícias (Bailey-Serres et al., 2012; Shimoia et al., 2023; da Silva Martins et al., 2023).

Com a grande redução na disponibilidade energética, absorção de água, redução de volume radicular impostos pelo alagamento, ocorre também a redução na absorção de nutrientes, dentre eles principalmente fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), manganês (Mn) e zinco (Zn), (Board, 2008). Entretanto, o que a maior deficiência nutricional encontrada em plantas de soja é de N. Como a principal fonte do elemento é o N₂ atmosférico, fixado por bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium*, e a fixação necessita uma grande quantidade de energia para manter a atividade da enzima

nitrogenase, sistema GS-GOGAT, dentre outras enzimas responsáveis pela fixação, o processo para já nas primeiras horas de alagamento (do Amarante et al., 2022). Além disso, todo o processo de ativação do sistema fermentativo também ocorre em nódulos devido à falta de O_2 , para sustentar a respiração das bactérias simbiontes (Borella et al., 2014; Borella et al., 2017).

Sabe-se que ocorre uma interação entre raízes e parte aérea para remobilizar N, estruturas carbônicas e regenerar poder redutor entre os órgãos na tentativa de promover maior tolerância ao déficit de N, para isso é de suma importância a plena atividade nas enzimas do sistema GS-GOGAT. (Vitor et al., 2019). O sistema GS-GOGAT, também é responsável por atender a demanda da fotorrespiração, consumindo a amônia gerada (Marino et al., 2022). Como o sistema GS-GOGAT tem sua atividade severamente reduzida durante o alagamento, o mecanismo deve ser útil até certo ponto durante o período de alagamento e bastante utilizado na reoxigenação para auxiliar a retomada do metabolismo. A redução na fixação de N_2 também ocorre devido a limitação da difusão do N_2 até o centro de reação da enzima nitrogenase nos bacterioides pois o N_2 também tem sua difusão limitada em água, assim como o O_2 .

Com a deficiência de nutrientes, principalmente N, começa ocorrer senescência foliar e degradação dos pigmentos fotossintéticos que podem servir como fonte de N para a planta (Liu et al., 2023). A senescência foliar também pode ocorrer devido ao estresse oxidativo ocasionado pelo excesso de energia luminosa que não está sendo corretamente aproveitado pelos fotossistemas (Posso et al., 2023). Porém na parte aérea das plantas o problema começa com a restrição hídrica, causada pelo mau funcionamento das aquaporinas. Com a redução na atividade das aquaporinas, ocorre redução no conteúdo de água da planta e esse processo gera uma sinalização para redução de g_s , justamente para diminuir a perda de água, ou seja, redução na E (Maurel et al., 2015). O grande problema que acompanha a redução na g_s é a redução no C_i . Reduções no C_i , em plantas com metabolismo fotossintético do tipo C3, levam a reduções na A (Adler et al., 2022). A redução na A em plantas expostas ao alagamento é bem descrita na literatura, e sua principal consequência é a redução na produção de açúcares, o que limita o crescimento das plantas (Agualongo et al., 2022). A manutenção dos açúcares em plantas expostas ao alagamento é de suma importância para servirem como substrato para o metabolismo fermentativo nas raízes (Agualongo et al., 2022; Sathi et al., 2022).

Na parte aérea com a redução de C_i , ocorre uma maior probabilidade da enzima Rubisco, atuar como oxigenase e não como carboxilase. A princípio o CO_2 é fixado pela enzima Rubisco, para formação de 3-fosfoglicerato (3-PGA). Porém a enzima Rubisco

também possui afinidade pelo oxigênio, formando também uma molécula de 2-fosfoglicolato (2-PGA) (Thomas, 2024). Mesmo a afinidade da enzima Rubisco sendo maior pelo CO_2 , a baixa concentração ($14 \mu\text{M}$) dele entorno do sítio ativo da enzima comparado ao O_2 ($263 \mu\text{M}$), faz com que ocorra uma taxa relativa de carboxilação em relação a oxigenação de 2,2 (Adler et al., 2022; Thomas, 2024). A 25°C , aproximadamente 25% do carbono fixado pela fotossíntese é perdido devido à fotorrespiração, se todas as reações de oxigenação fossem substituídas por reações de carboxilação, a absorção de CO_2 aumentaria em ca. 53% (Long et al., 2021). No processo de fotorrespiração a planta perde moléculas de carbono valiosas na forma de CO_2 e despende uma energia que poderia estar sendo utilizada de outras maneiras. Porém, por outro lado, regenera poder redutor (NAD, FAD, NADP) atuando em auxílio à fotossíntese, principalmente em casos de estresses. Além disso, a fotorrespiração também interliga os metabolismos do carbono e nitrogênio.

O que ocorre juntamente com o processo de fotorrespiração é uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente H_2O_2 , formado pela conversão de glicolato em glioxilato, porém esse H_2O_2 é rapidamente degradado pelo sistema antioxidante (Vital et al., 2022). A formação de espécies reativas de oxigênio são um problema durante o alagamento por causarem principalmente danos às membranas de fosfolípidos (da Silva Martins et al., 2023; Posso et al., 2023). Durante o alagamento, a concentração de H_2O_2 é acentuada no início do estresse com tendência de reduzir com o passar do tempo (da-Silva e Amarante 2020a). A molécula de H_2O_2 , inicialmente atua sinalizando e ativando mecanismos de resposta ao estresse para a planta, contudo sua grande produção e acúmulo ocorre nas raízes principalmente no início do período de reoxigenação, quando a planta já está debilitada (Aguilongo et al., 2022; Posso et al., 2023; da-silva et al., 2021). Isso ocorre porque durante o período de alagamento a falta de O_2 é tão grande no sistema radicular que quando o O_2 entra novamente no sistema acaba interagindo com quase todos os metabólitos capazes de sofrer oxidação.

Para evitar grandes danos, a planta ativa os seus mecanismos antioxidantes, sejam eles enzimáticos ou não enzimáticos. Esse aumento na atividade de antioxidantes é uma característica marcante em plantas de soja expostas ao estresse e utilizado para selecionar cultivares tolerantes (de Oliveira et al., 2022; Garcia et al., 2020). Com a ativação do sistema antioxidante, a planta enfrenta um outro problema que é a limitação de N para formação de proteínas, devido a parada da fixação de N_2 pelas bactérias. Com isso, a redução das proteínas durante o alagamento é certa (Amarante et al., 2022).

Após o período de alagamento é possível observar que mesmo a planta utilizando de

todas as formas para tentar sobreviver ao estresse, ainda assim apresenta um porte reduzido, área foliar menor e massa tanto de parte aérea quanto de raízes reduzidos (Posso et al., 2023; da Silva et al., 2021; Agualongo et al., 2022). Os efeitos deletérios do alagamento também são percebidos nos nódulos, formados pela simbiose com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, em que variáveis como, número de nódulos, massa de nódulos, volume de nódulos e capacidade de fixar N₂ ficam severamente reduzidos com a falta de O₂ (Amarante et al., 2022; Shimoia et al., 2023). Apesar de plantas noduladas responderem melhor ao alagamento que plantas não noduladas (Borella et al., 2014.), ao final do período de estresse, há gasto de energia, estresse oxidativo, redução na absorção de nutrientes e perda de capacidade de realizar fotossíntese, o que limita o rendimento das culturas (Kaur et al., 2020).

1.3 Coinoculação (*Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Rhizophagus*)

A demanda por alimentos sempre fez com que o homem expandisse as áreas de cultivos agrícolas em busca de maior produção vegetal, contudo nas últimas décadas isso senário tem mudado devido a redução na área de terras inexploradas e o desenvolvimento de novas tecnologias que permitem rendimentos mais elevados na mesma área (Santos et al., 2019). Assim a adoção de inoculantes microbianos é uma opção para melhorar o rendimento das culturas e ainda reduzir os custos. A redução nos custos é devido a menor necessidade de fertilizantes químicos, por exemplo (Santos et al., 2019). Inoculantes são produtos que possuem em sua composição microrganismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais. Os microrganismos mais utilizados, são os “rizóbios”, principalmente os diazotróficos (Santos et al., 2019).

Os microrganismos são responsáveis por promover o crescimento e desenvolvimento vegetal de forma direta, via aumento da capacidade de absorver água, nutrientes e produção de fitohormônios ou então de forma indireta, promovendo a tolerância das plantas a fatores bióticos e abióticos (Glick, 2012; Verma et al., 2019). O *Bradyrhizobium*, por exemplo, é especialista em fixar N₂, enquanto o *Azospirillum*, apesar de também fixar N₂, também contribui na produção e modulação de fitohormônios (Cassán et al., 2014; Zeffa et al., 2020). Desta forma tanto bactérias do gênero *Bradyrhizobium* quanto do gênero *Azospirillum* podem ser chamadas de bactérias promotoras do crescimento de plantas (em inglês PGPB).

O gênero *Bradyrhizobium* é considerado o principal gênero de rizóbios que estabelece simbiose com a cultura da soja. Já foram descritas 41 espécies de *Bradyrhizobium*, dentre elas *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* (Zeffa et al., 2020). Pertencem a família das alfa-proteobactérias, são gram-negativas, aeróbicas, formadores de nódulos em plantas leguminosas, possuem crescimento lento em meio de extrato de leveduras contendo manitol

(3-4 dias, 25°C), no interior dos nódulos se apresentam como bastonetes levemente crescidos (0,5 a 0,9 µm por 1,2 a 3,0 µm). (Jordan, 1982; Rivas et al., 2009). Este gênero de bactérias basicamente fixa o N₂ atmosférico via enzima nitrogenase e fornece N para planta principalmente na forma de ureídeos. No Brasil sempre se utilizou a adoção conjunta de duas cepas de *Bradyrhizobium* devido a maior eficiência na fixação de N₂, taxa de ocupação dos nódulos pelas bactérias e competitividade com as bactérias nativas do solo (Boddey e Hungria 1997; Hungria et al., 1998; Campos et al., 2001). Para que ocorra a fixação do N₂, as plantas fornecem carboidratos para as bactérias na forma de sacarose que rapidamente é convertida em malato ou succinato para servir como fonte de energia na respiração das bactérias, assim gerando a energia necessária para fixar o N₂ (Rogers et al., 2009). Todo esse processo ocorre na célula infectada, a qual é protegida por uma camada de células mais densa para evitar a difusão de O₂. No bacterióide, dentro do nódulo, é onde ocorre a fixação de N₂ em NH₃, pois lá a concentração de O₂ é regulada por mais uma proteína com alta afinidade pelo O₂ (leghemoglobina) devido a sensibilidade dos centros de reação da enzima nitrogenase ao O₂ (Verma et al., 2019).

O processo de fixação de N₂ por *Bradyrhizobium* é afetado negativamente por fatores ambientais estressantes como altas temperaturas, salinidade, déficit hídrico, alagamento dentre outros fatores (Aranjuelo et al., 2004). Durante o alagamento, devido à baixa difusão dos gases em água, ocorre a redução na disponibilidade tanto do O₂ quanto do N₂ e assim, a fixação de N₂ fica prejudicada. Isso ocorre devido a falta de energia advinda da respiração celular promovida pelo O₂ e falta de substrato para a enzima nitrogenase (Justino e Sodek et al., 2013; Amarante et al., 2022), porém, estudos tem mostrado que o aumento na concentração de CO₂ atmosférico tem beneficiado a simbiose e fixação de N₂. Com mais eficiência fotossintética, a planta consegue fornecer mais carboidratos para as bactérias que por sua vez retribuem fixando mais N₂. O processo também pode ser governado por uma maior demanda por parte da própria planta (Aranjuelo et al., 2014; Rogers et al., 2009). Além do e[CO₂] a técnica de coinoculação da soja com *Azospirillum* também tem melhorado a eficiência do processo de fixação de N₂ desempenhado por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Barbosa et al., 2021).

O gênero *Azospirillum* também pertence à família das alfa-proteobactérias, é gram-negativo, possui um flagelo polar e laterais, possuem a capacidade de colonizar tanto gramíneas quanto leguminosas, são de vida livre, microaerófilo, não fermentativo e fixador de N₂ (Döbereiner e Pedrosa, 1987; Huergo et al., 2008). Seu principal atributo, além da fixação de N₂ (Day e Döbereiner 1976), é a produção de fitohormônios, auxinas, giberelinas,

citocininas e etileno (Reynders e Valssak 1979; Tien et al., 1979; Cassán et al., 2014; Khan et al., 2020). Tão complexo quanto a produção fitohormônios por *Azospirillum* é sua capacidade de fixar N₂. A regulação da fixação de N₂ por *Azospirillum* ocorre pelos níveis tanto do NH₄⁺, quanto ao O₂ (Zhang et al., 1997). Em bactérias do gênero *Azospirillum*, o controle de O₂, é realizado por uma proteína similar a leghemoglobina, expressa pelos genes *fixLJ* e *fixK*, sensíveis ao O₂. tornando meio micro-aeróbico, caso contrário a fixação é inibida (Ruiz-Argüeso et al., 2001; Sant'Anna et al., 2011; Sullivan et al., 2013; Batista et al., 2019)

Os benefícios da coinoculação das culturas com *Azospirillum*, ultrapassa os limites da fixação de N₂, plantas coinoculadas com esse microrganismo conseguem resistir melhor a estresses bióticos e abióticos (Fulkami et al., 2018a). Em suma, as melhores respostas das plantas ao estresses após a associação com *Azospirillum*, deve-sea sua capacidade de melhorar a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (CAT, SOD APX) e produção de óxido nítrico (NO) (Fulkami et al., 2018; Creus et al., 2005). O NO, independentemente de sua fonte, pode atuar tanto na detoxificação de espécies reativas de oxigênio quanto em melhores respostas do metabolismo fermentativo durante estresse por alagamento (da-Silva e do Amarante, 2020). Shimoia et al., (2023), descreveu efeitos benéficos da coinoculação de plantas de soja com *Azospirillum*, mesmo em condições de alagamento. Além disso, a coinoculação das plantas com *Azospirillum* permite a interação direta dos microrganismos com a síntese de etileno na planta (Cassán et al., 2014; Pons et al., 2020). Após a sinalização necessária com a produção de etileno, no início do estresse, o fitohormônio não se acumula nas raízes ocasionando danos. Os microrganismos são capazes de diminuir a produção de etileno, ativando a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase). Essa enzima atua degradando 1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor imediato do etileno, formando amônia e α -cetobutirato (Li et al., 2005; Gilck 2014; Chieb et al., 2023). O *Azospirillum* também é capaz de melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas, dentre eles, N, P, K, S, Fe e Mg e uma das razões das plantas melhorarem a absorção destes nutrientes é o aumento do sistema radicular proporcionado pela ação da bactéria (Etesami et al., 2020).

Outro microrganismo também capaz de melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas são os fungos micorrízicos. Depois de associados com as raízes das plantas, esses microrganismos aumentam o volume radicular favorecendo a absorção de nutrientes. Da mesma forma os nutrientes podem ter sua absorção aumentada por conta das hifas dos fungos micorrízicos, que disponibilizam esses nutrientes para as plantas (Vergara et al., 2018). Os fungos micorrízicos, são fungos que possuem a capacidade de fazer associações benéficas

com as raízes das plantas, por isso receberam este nome. A maior parte dos fungos micorrízicos são Ficomicetas, da ordem Mucorales e classificados na família Endogonaceae (Brundrett, 2004). Apesar da maioria dos fungos micorrízicos serem classificados como endomicorrizas, eles ainda podem ser classificados como ectomicorrizas ou ectoendomicorrizas (Smith e Hoffmann, 2008). A diferença entre estas classes de micorrizas é basicamente a forma de interação com a planta. Ectomicorrizas, colonizam as raízes, sem que as hifas entrem nas células, ocorrendo a formação de um manto fúngico ao redor das raízes; endomicorrizas são capazes de estender suas hifas dentro das células corticais das raízes; ectoendomicorrizas, apresentam as características de ambas as duas classes anteriores (Brundrett, 2004; Hoffmann e Lucena, 2006).

As micorrizas da classe das endomicorrizas, podem ser classificadas ainda em arbusculares, ericóide e orquíide (Smith e Read, 2008). A micorriza arbuscular leva essa denominação devido a sua capacidade de formar arbúsculos dentro das células corticais das raízes da planta hospedeira e é encontrada em aproximadamente 80% das plantas vasculares (Eun Kang et al., 2020). Cerca de 300 espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foram formalmente descritas (Lista de Espécies de Glomeromycota, 2019). Entre eles, *Rhizophagus intraradices* (NC Schenck & GS Sm.) C. Walker & A. Schüßler (até recentemente classificado como *Glomus intraradices*) é uma espécie generalista encontrada distribuída em diferentes ambientes. Os arbúsculos são estruturas localizadas dentro das células radiculares, onde ocorre a maior parte das trocas planta-microrganismo. As outras duas classificações, ericóide e orquíide, apenas fazem menção a família de plantas colonizada por cada uma, Ericaceae e Orchidaceae (Sedaghati et al., 2021). Independente do tipo de micorriza são evidentes os benefícios da simbiose de micorrizas com plantas, o que melhora as respostas das plantas a doenças, promove a interação com bactérias benéficas do solo, promove o crescimento das plantas e absorção de nutrientes, dentre eles principalmente N e P (Amballa et al., 2016).

A demanda global por fósforo é crescente, porém as fontes do nutriente são finitas, estimasse que em 2050 a demanda pelo nutriente será maior que a disponibilidade (Nedelciu et al, 2020). Assim alternativas que aumentem tanto a absorção quanto a disponibilidade do elemento para as plantas são cada vez mais importantes para a agricultura. As plantas são capazes de fornecer até 20% do carbono assimilado fotosinteticamente, em troca os FMA, fornecem também nutrientes como P e Mg (Wright et al., 1998; Qin et al., 2020). O aumento na absorção de P e Mg é tão significativo em plantas micorrizadas que seu efeito é observado mesmo em solos com pouca disponibilidade dos elementos, resultado em maiores massas

radiculares (Qin et al., 2020). Esse aumento de massa de raízes, principalmente comprimento, está diretamente relacionado com uma exploração maior do solo pelas raízes, permitindo a absorção do elemento em regiões antes não ocupadas pelas raízes. Além do crescimento radicular outros mecanismos estão envolvidos na maior absorção do nutriente, como exsudação de ácidos orgânicos, excreção de enzimas extracelulares e degradação de substrato via mineralização (Rawat et al., 2021). Ácidos orgânicos como cítrico, glucônico, oxálico, tartárico, conseguem quelar cátions ligados ao fosfato, disponibilizando o P para a absorção (Kishore et al., 2015). Além disso pode ocorrer a solubilização do fosfato via fosfatases ácidas não específicas, que também resultam em uma maior absorção de P pelas plantas (Kumar e Shastri, 2017).

O aumento na absorção de P por plantas é de suma importância por diversos motivos, um deles está diretamente relacionado com maiores taxas de fixação de N₂, bem como melhorias na nodulação de plantas (Gorka et al., 2019). Nódulos de plantas leguminosas apresentam diferentes estratégias para manter a homeostase do elemento mesmo em condições de baixa disponibilidade, como aumento na absorção do elemento, armazenamento e reciclagem de P (Suliman e Tran, 2015). Estima-se que até 20% do total de P da planta seja alocado para os nódulos para proporcionar a melhor simbiose entre planta-organismo (Kouas et al., 2005). FMA, melhoram os fatores de nodulação, como número de nódulos, massa de nódulos, volume de nódulos e fixação de N₂ por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em plantas de soja coinoculadas (Bulgareli et al., 2017). O fósforo é diretamente ligado a produção de energia, estruturas celulares como constituintes de ésteres fosfóricos, fosfolipídios e nucleotídeos (ATP, DNA, RNA) (Sardans et al., 2012). Esse fenômeno é bem explicado pelo aumento na disponibilidade de P proporcionado pelas hifas do FMA aos nódulos e as raízes das plantas (Gorka et al., 2019). Além disso, as hifas do FMA também conseguem aumentar a absorção de N diretamente do solo, o que auxilia na manutenção do balanço de nitrogênio da planta (Gorka et al., 2019). Aumentos na produtividade das culturas da soja e milho são relatados na literatura após a coinoculação das plantas com FMA (Stoffel et al., 2020a,b). FMA, também estão envolvidos com melhores respostas de plantas a estresses seja biótico ou abiótico como infecção por *Macrophomina phaseolina*, déficit hídrico e alagamento (Ruiz-Lozano, 2003; Birhane et al., 2012; Spagnoletti et al., 2020; Shimoia et al., 2023).

O papel de cada microrganismo com as plantas já é bem claro e descrito na literatura. Além disso a prática de coinoculação seja ela com FMA ou PGPB é uma realidade e está auxiliando em muito a produtividade, otimização de recursos naturais e tolerância das plantas

a fatores estressantes (Zeffa et al., 2020; Kalamulla et al., 2022). Revisão realizada por Santos et al., (2019) revela, usando dados do Web of Science, que entre 2015 e 2019, foram publicados 68 artigos (excluindo revisões) utilizando as palavras-chave “inoculante” ou “biofertilizante” seguidas de “produção” ou “desenvolvimento”.

Estudos como de Juge et al., (2012), que descrevem o comportamento planta-microrganismo em coinoculação tripla, envolvendo *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Rhizophagus*, são de suma importância para entendermos, além da resposta de cada forma de coinoculação como as respostas se apresentam em conjunto. Assim facilitando a utilização correta destes microrganismos. A exposição da coinoculação tripla a fatores ambientais estressantes também é importante, visto que cada microrganismo pode apresentar uma forma de beneficiar a planta.

A interação das plantas com inúmeros microrganismos presentes no solo é inevitável, seja ela benéfica ou não. Sendo assim, é importante investigarmos como funcionam e utilizar de ferramentas para promover o aumento de associações ou simbioses que beneficiem as culturas. Estudos direcionados ao entendimento, desenvolvimento de técnicas e tecnologias que promovam uma agricultura sustentável são de suma importância, principalmente com o aumento na intensidade das mudanças climáticas, o que demanda maior eficiência em todas as etapas da produção agrícola.

2 REFERÊNCIAS

- Adler, L., Díaz-Ramos, A., Mao, Y., Pukacz, K. R., Fei, C., & McCormick, A. J. (2022). New horizons for building pyrenoid-based CO₂-concentrating mechanisms in plants to improve yields. *Plant physiology*, 190(3), 1609-1627. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac373>
- Agualongo, D. A. P., Da-Silva, C. J., Garcia, N., de Oliveira, F. K., Shimoia, E. P., Posso, D. A., ... & do Amarante, L. (2022). Waterlogging priming alleviates the oxidative damage, carbohydrate consumption, and yield loss in soybean (*Glycine max*) plants exposed to waterlogging. *Functional Plant Biology*, 49(12), 1029-1042. <https://doi.org/10.1071/FP22030>
- Ainsworth, E. A., & Rogers, A. (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, cell & environment*, 30(3), 258-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x>
- Amballa, H., Bhumi, N.R. (2016). Significance of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizosphere Microflora in Plant Growth and Nutrition. In: Choudhary, D., Varma, A., Tuteja, N. (eds) *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0_19
- Antônio, C., Pöpke, C., Rocha, M., Diab, H., Limami, A. M., Obata, T., ... & van Dongen, J. T. (2016). Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution. *Plant Physiology*, 170(1), 43-56. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00266>
- Aranjuelo, I., Arrese-Igor, C., & Molero, G. (2014). Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of plant physiology*, 171(12), 1076-1090. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.002>
- Arenque, B. C., Grandis, A., Pocius, O., de Souza, A. P., & Buckeridge, M. S. (2014). Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian floodplains, to elevated atmospheric CO₂ concentration and waterlogging. *Trees*, 28, 1021-1034. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1015-0>
- Armstrong W, Strange ME, Cringle S, Beckett PM (1994) Microelectrode and modeling study of oxygen distribution in roots. *Annals of Botany* 74: 287-299
- Armstrong, W; Brändle, R; Jackson, M. B. (1994). Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 43(4), p. 307-358.
- Bailey-Serres, J., Lee, S. C., & Brinton, E. (2012). Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant physiology*, 160(4), 1698-1709. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208173>
- Barbosa, J. Z., Hungria, M., da Silva Sena, J. V., Poggere, G., dos Reis, A. R., & Corrêa, R. S. (2021). Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium spp.* in Brazil. *Applied Soil Ecology*, 163, 103913. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>
- Bernacchi, C. J., Leakey, A. D., Heady, L. E., Morgan, P. B., Dohleman, F. G., McGrath, J. M., ... & Ort, D. R. (2006). Hourly and seasonal variation in photosynthesis and stomatal conductance of soybean grown at future CO₂ and ozone concentrations for 3 years under fully

- open-air field conditions. *Plant, Cell & Environment*, 29(11), 2077-2090. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01581.x>
- Birhane, E., Sterck, F. J., Fetene, M., Bongers, F., & Kuyper, T. W. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia*, 169, 895-904. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2258-3>
- Bloom AJ, Burger M, Asensio JS, Cousins AB. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science*. 2010 May 14;328(5980):899-903. DOI: 10.1126/science.1186440
- Board, J. E. (2008). Waterlogging effects on plant nutrient concentrations in soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 31(5), 828-838. <https://doi.org/10.1080/01904160802043122>
- Boddey, L. H., & Hungria, M. (1997). Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 25, 407-415. <https://doi.org/10.1007/s003740050333>
- Borella, J., Amarante, L. D., Oliveira, D. D. S. C. D., Oliveira, A. C. B. D., & Braga, E. J. B. (2014). Waterlogging-induced changes in fermentative metabolism in roots and nodules of soybean genotypes. *Scientia Agricola*, 71, 499-508. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0044>
- Borella, J., Oliveira, H. C., de Oliveira, D. D. S. C., Braga, E. J. B., de Oliveira, A. C. B., Sodek, L., & do Amarante, L. (2017). Hypoxia-driven changes in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolites of two nodulated soybean genotypes. *Environmental and experimental botany*, 133, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.007>
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews*, 79(3), 473-495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Bulgarelli, R. G., Marcos, F. C. C., Ribeiro, R. V., & de Andrade, S. A. L. (2017). Mycorrhizae enhance nitrogen fixation and photosynthesis in phosphorus-starved soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Environmental and experimental botany*, 140, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.015>
- Campos, B. C., Hungria, M., & Tedesco, V. (2001). Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. *Revista brasileira de ciência do solo*, 25, 583-592. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832001000300007>
- Cassán, F., Vanderleyden, J. & Spaepen, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33, 440–459 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>
- Cernusak, L. A., Winter, K., Martínez, C., Correa, E., Aranda, J., Garcia, M., ... & Turner, B. L. (2011). Responses of legume versus nonlegume tropical tree seedlings to elevated CO₂ concentration. *Plant physiology*, 157(1), 372-385. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182436>
- Chieb, M., Gachomo, EW O papel das rizobactérias promotoras do crescimento das plantas nas respostas ao estresse hídrico das plantas. *BMC Planta Biol* 23 , 407 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>

Creus, C. M., Graziano, M., Casanovas, E. M., Pereyra, M. A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., ... & Lamattina, L. (2005). Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta*, 221, 297-303. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1523-7>

Cummins, P. L. (2021). The coevolution of RuBisCO, photorespiration, and carbon concentrating mechanisms in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 662425. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.662425>

da Silva Martins, T., Da-Silva, C. J., Shimoia, E. P., Posso, D. A., Carvalho, I. R., de Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Nitrate supply decreases fermentation and alleviates oxidative and ionic stress in nitrogen-fixing soybean exposed to saline waterlogging. *Functional Plant Biology*, 50(5), 416-433. <https://doi.org/10.1071/FP22145>

da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020a). Short-term nitrate supply decreases fermentation and oxidative stress caused by waterlogging in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104078. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104078>

Da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020b). Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104242. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104242>

da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020c). Short-term nitrate supply decreases fermentation and oxidative stress caused by waterlogging in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104078. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104078>

Da-Silva, C. J., Shimoia, E. P., Posso, D. A., Cardoso, A. A., Batz, T. A., Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2021). Nitrate nutrition increases foliar levels of nitric oxide and waterlogging tolerance in soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03291-5>

Divisão de Assistência Técnica e Extensão Rural, Seção de Política Setorial, meteorologista Jossana Ceolin Cera, Coordenadorias Regionais e NATE's (Núcleos de Assistência Técnica e Extensão) e a Divisão de Pesquisa do IRGA. Em 19 de setembro de 2022.

Döbereiner J, Marriel IE, Nery M (1976) Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22:1464–1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>

Döbereiner, J., Pedrosa, F. O. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in Nonleguminous Crop plants. New York: Sci.Tech.Publishers/Springer-Verlag 155 p.

Drag, D. W., Slattery, R., Siebers, M., DeLucia, E. H., Ort, D. R., & Bernacchi, C. J. (2020). Soybean photosynthetic and biomass responses to carbon dioxide concentrations ranging from pre-industrial to the distant future. *Journal of experimental botany*, 71(12), 3690-3700. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa133>

Etesami, H., Adl, S.M. (2020). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Action Mechanisms in Availability of Nutrients to Plants. In: Kumar, M., Kumar, V., Prasad, R. (eds) *Phyto-Microbiome in Stress Regulation*. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_9

Eun Kang, J., Ciampi, A., & Hijri, M. (2020). SeSaMe: metagenome sequence classification of arbuscular mycorrhizal fungi-associated microorganisms. *Genomics, Proteomics and*

Bioinformatics, 18(5), 601-612. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.07.010>

Faria, A.P., Marabesi, M.A., Gaspar, M., and França, M.G., (2018). The increase of current atmospheric CO₂ and temperature can benefit leaf gas exchanges, carbohydrate content and growth in C₄ grass invaders of the Cerrado biome, *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 127, p. 608. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.042>

Ferrario-Mery, S., Hodges, M., Hirel, B., & Foyer, C. H. (2002). Photorespiration-dependent increases in phospho enol pyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta*, 214, 877-886. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0692-2>

Fukami, J., Cerezini, P. & Hungria, M. (2018a). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr* 8, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

Fukami, J., Ollero, F. J., de la Osa, C., Valderrama-Fernandez, R., Nogueira, M. A., Megías, M., & Hungria, M. (2018b). Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of microbiology*, 200, 1191-1203. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>

Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00340>

Garcia, N., da-Silva, C. J., Cocco, K. L. T., Pomagualli, D., de Oliveira, F. K., da Silva, J. V. L., ... & do Amarante, L. (2020). Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through different physiological and biochemical mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 172, 103975. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.103975>

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>

Glomeromycota Species List (2019). [cited 2019 Nov 15]. Available from: http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html

Gorka, S., Dietrich, M., Mayerhofer, W., Gabriel, R., Wiesenbauer, J., Martin, V., ... & Kaiser, C. (2019). Rapid transfer of plant photosynthates to soil bacteria via ectomycorrhizal hyphae and its interaction with nitrogen availability. *Frontiers in microbiology*, 10, 168. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00168>

Hao, X., Li, P., Han, X., Norton, R. M., Lam, S. K., Zong, Y., ... & Gao, Z. (2016). Effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on N, P and K uptake of soybean in northern China. *Agricultural and Forest Meteorology*, 218, 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.12.061>

Hartman, S., Liu, Z., Van Veen, H., Vicente, J., Reinen, E., Martopawiro, S., ... & Voesenek, L. A. (2019). Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress.

Nature Communications, 10(1), 4020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12045-4>

Hoffmann, L. V.; Lucena, V. S. Para entender micorrizas arbusculares. Campina Grande: Embrapa Algodão, (2006). 22. (Embrapa Algodão, Documento 156).

Huergo, L. F., Monteiro, R. A., Bonatto, A. C., Rigo, L. U., Steffens, M. B. R., Cruz, L. M., ... & Pedrosa, F. O. (2008). Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. Cassán, Fd; Garcia De Salamone, I. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 17-35.

Hungria, M., Boddey, L. H., Santos, M. A., & Vargas, M. A. T. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. Biology and fertility of soils, 27, 393-399. <https://doi.org/10.1007/s003740050449>

Jordan, D. C. (1982). 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 and Evolutionary Microbiology, 32(1), 136-139. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>

Juge, C., Prévost, D., Bertrand, A., Bipfubusa, M., & Chalifour, F. P. (2012). Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. Applied Soil Ecology, 61, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.05.006>

Justino, G. C., & Sodek, L. (2013). Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulated root system of soybean. Journal of Plant Physiology, 170(3), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.006>

Kalamulla, R., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Galappaththi, M. C., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., ... & Yapa, N. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. Sustainability, 14(19), 12250. <https://doi.org/10.3390/su141912250>

Kaur, G., Singh, G., Motavalli, P. P., Nelson, K. A., Orlowski, J. M., & Golden, B. R. (2020). Impacts and management strategies for crop production in waterlogged or flooded soils: A review. Agronomy Journal, 112(3), 1475-1501. <https://doi.org/10.1002/agj2.20093>

Khan, N., Bano, A., Ali, S., & Babar, M. A. (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. Plant Growth Regulation, 90, 189-203. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00571-x>

Kishore N, Pindi PK, Reddy SR (2015) Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K (eds) Plant Biology and Biotechnology. Springer, New Delhi, pp 307–333. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12

Kouas, S., Labidi, N., Debez, A., & Abdelly, C. (2005). Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agronomy for Sustainable Development, 25(3), 389-393. DOI: 10.1051/agro:2005034

Kozaki, A., and Takeba, G. (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. Nature 384, 557–560. doi: 10.1038/384557a0

Kuhnert, F., Schlüter, U., Linka, N., & Eisenhut, M. (2021). Transport proteins enabling plant photorespiratory metabolism. *Plants*, 10(5), 880. <https://doi.org/10.3390/plants10050880>

Kumar R, Shastri B (2017) Role of phosphate-solubilising microorganisms in sustainable agricultural development. In: Singh J, Seneviratne G (eds) *Agro-Environmental Sustainability*. Springer, Cham, pp 271–303. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_13

Li, Q., Saleh-Lakha, S., & Glick, B. R. (2005). The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Canadian journal of microbiology*, 51(6), 511-514. <https://doi.org/10.1139/w05-027>

Li, Y., Yu, Z., Liu, X., Mathesius, U., Wang, G., Tang, C., ... & Jin, J. (2017). Elevated CO₂ increases nitrogen fixation at the reproductive phase contributing to various yield responses of soybean cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1546. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01546>

Liat Adler, Aranzazú Díaz-Ramos, Yuwei Mao, Krzysztof Robin Pukacz, Chenyi Fei, Alistair J McCormick, (2022). New horizons for building pyrenoid-based CO₂-concentrating mechanisms in plants to improve yields, *Plant Physiology*, Volume 190, Issue 3, November, Pages 1609–1627, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac373>

Liu Y, Gao S, Hu Y, Zhang T, Guo J, Shi L, Li M. (2023). Comparative study of leaf nutrient reabsorption by two different ecotypes of wild soybean under low-nitrogen stress. *PeerJ* 11:e15486 <https://doi.org/10.7717/peerj.15486>

Long SP. (1991). Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: has its importance been underestimated?. *Plant, Cell & Environment*. Oct;14(8):729-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01439.x>

Ma, X., & Bai, L. (2021). Elevated CO₂ and reactive oxygen species in stomatal closure. *Plants*, 10(2), 410.. <https://doi.org/10.3390/plants10020410>

Magalhães, P.C; Coelho, C.H.M; Gama, E.E.G; Borém, A. (2005). Avaliação dos ciclos de seleção da variedade BRS 4154 – Saracura para tolerância ao encharcamento do solo. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 67p.

Batista, B. M., Ray D.; Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochem Soc Trans* 30 April 2019; 47 (2): 603–614. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20180342>

Marino, D., Cañas, R. A., & Betti, M. (2022). Is plastidic glutamine synthetase essential for C3 plants? A tale of photorespiratory mutants, ammonium tolerance and conifers. *New Phytologist*, 234(5), 1559-1565. <https://doi.org/10.1111/nph.18090>

Marino, D., Cañas, R. A., & Betti, M. (2022). Is plastidic glutamine synthetase essential for C3 plants? A tale of photorespiratory mutants, ammonium tolerance and conifers. *New Phytologist*, 234(5), 1559-1565. <https://doi.org/10.1111/nph.18090>

Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D. T., Santoni, V., Shahzad, Z., & Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiological reviews*, 95(4), 1321-1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>

Nair, R. M., Boddepalli, V. N., Yan, M. R., Kumar, V., Gill, B., Pan, R. S., ... & Somta, P.

(2023). Global status of vegetable soybean. *Plants*, 12(3), 609. <https://doi.org/10.3390/plants12030609>

Nedelciu, C. E., Ragnarsdottir, K. V., Schlyter, P., & Stjernquist, I. (2020). Global phosphorus supply chain dynamics: Assessing regional impact to 2050. *Global food security*, 26, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100426>

Palit, P., Kudapa, H., Zougmore, R., Kholova, J., Whitbread, A., Sharma, M., & Varshney, R. K. (2020). An integrated research framework combining genomics, systems biology, physiology, modelling and breeding for legume improvement in response to elevated CO₂ under climate change scenario. *Current Plant Biology*, 22, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100149>

Ploschuk, R.A., Miralles, D.J. & Striker, G.G. (2022). A quantitative review of soybean responses to waterlogging: agronomical, morpho-physiological and anatomical traits of tolerance. *Plant Soil* 475, 237–252. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05364-x>

Pons, S., Fournier, S., Chervin, C., Bécard, G., Rochange, S., Frei Dit Frey, N., & Puech Pagès, V. (2020). Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *PLoS One*, 15(10), e0240886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886>

Qin, J., Wang, H., Cao, H., Chen, K., & Wang, X. (2020). Combined effects of phosphorus and magnesium on mycorrhizal symbiosis through altering metabolism and transport of photosynthates in soybean. *Mycorrhiza*, 30, 285-298. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00955-x>

Rakhmankulova, Z.F., Shuyskaya, E.V., Prokofieva, M.Y. et al. Effect of Elevated CO₂ and Temperature on Plants with Different Type of Photosynthesis: Quinoa (C3) and Amaranth (C4). *Russ J Plant Physiol* 70, 117 (2023). <https://doi.org/10.1134/S1021443723601349>

Raschke K, Shabahang M, Wolf R. (2003). The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta*. Aug;217:639-50. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1033-4>

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 49-68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

Ribas, G. G., Zanon, A. J., Streck, N. A., Pilecco, I. B., de Souza, P. M., Heinemann, A. B., & Grassini, P. (2021). Assessing yield and economic impact of introducing soybean to the lowland rice system in southern Brazil. *Agricultural Systems*, 188, 103036. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.103036>

Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P., & Willems, A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(2), 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.005>

Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., & Van Dongen, J. T. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant*

Physiology, 152(3), 1501-1513. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150045>

Rocha, T. S. M. D., Streck, N. A., Zanon, A. J., Marcolin, E., Petry, M. T., Tagliapietra, E. L., ... & Bexaira, K. P. (2017). Performance of soybean in hydromorphic and nonhydromorphic soil under irrigated or rainfed conditions. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 52, 293-302. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000500002>

Rogers, A., Ainsworth, E. A., & Leahey, A. D. (2009). Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes?. *Plant Physiology*, 151(3), 1009-1016. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144113>

Ruiz-Argüeso, T., Palacios, JM & Imperial, J. Regulação do sistema hidrogenase em *Rhizobium leguminosarum*. *Planta e Solo* 230, 49–57 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1004578324977>

Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13, 309-317. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0237-6>

Sant'Anna, F. H., Almeida, L. G., Cecagno, R., Reolon, L. A., Siqueira, F. M., Machado, M. R., ... & Schrank, I. S. (2011). Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC genomics*, 12, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-409>

Santos, M.S., Nogueira, M.A. & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Expr* 9, 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Sartori, g. M. S; marchesan, e; azevedo, c. F; roso, r; coelho, l. L; Oliveira, m. L. (2013). Effects of irrigated rice sowing season and imazapyr+ imazapic time of application on rice grain yield and red rice management. *Planta Daninha*, 31(3), 631-644 <https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000300015>

Sathi, K.S., Masud, A.A.C., Anee, T.I., Rahman, K., Ahmed, N., Hasanuzzaman, M. (2022). Soybean Plants Under Waterlogging Stress: Responses and Adaptation Mechanisms. In: Hasanuzzaman, M., Ahammed, G.J., Nahar, K. (eds) *Managing Plant Production Under Changing Environment*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5059-8_5

Sedaghati, E., Yazdanpanah, M., & Nadi, M. (2021). A review of taxonomic studies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Iran. *Mycologia Iranica*. DOI: 10.22043/MI.2022.358512.1215

Shardendu K. Singh, Vangimalla R. Reddy, David H. Fleisher & Dennis J. Timlin (2014) Growth, nutrient dynamics, and efficiency responses to carbon dioxide and phosphorus nutrition in soybean, *Journal of Plant Interactions*, 9:1, 838-849, <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.959570>

Shimoia, E. P., Da-Silva, C. J., Posso, D. A., da Silva Martins, T., Agualongo, D. A. P., de Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Co-inoculation of Seeds with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and *Rhizophagus* Improves Nitrogen Assimilation and Growth in Soybean Plants Subjected to Waterlogging. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 146. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601040>

- Smith, S. E.; Read, D. (2008). Growth and carbon economy of arbuscular mycorrhizal symbionts. In: SMITH, S. E.; READ, D. Mycorrhizal Symbiosis. New York. p. 117-137. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6..>
- Soba, D., Aranjuelo, I., Gakière, B., Gilard, F., Pérez-López, U., Mena-Petite, A., ... & Sanz-Saez, A. (2021). Soybean inoculated with one *Bradyrhizobium* strain isolated at elevated [CO₂] show an impaired c and n metabolism when grown at ambient [CO₂]. *Frontiers in Plant Science*, 12, 656961. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656961>
- Spagnoletti, F. N., Cornero, M., Chiocchio, V., Lavado, R. S., & Roberts, I. N. (2020). Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 839-849. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01934-w>
- Stoffel, S. C. G., Meyer, E., & Lovato, P. E. (2020a). Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 16(5), 702-713. <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.14766>
- Stoffel, S. C. G., Soares, C. R. F. S., Meyer, E., Lovato, P. E., & Giachini, A. J. (2020b). Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Ciência Rural*, 50, e20200109. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200109>
- Sulieman, S., & Tran, L. S. P. (2015). Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Science*, 239, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.018>
- Sullivan JT, Brown SD, Ronson CW (2013) The NifA-RpoN Regulon of *Mesorhizobium loti* Strain R7A and Its Symbiotic Activation by a Novel LacI/GalR-Family Regulator. *PLoS ONE* 8(1): e53762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053762>
- Thomas D Sharkey, (2024). The end game(s) of photosynthetic carbon metabolism, *Plant Physiology*, kiad601, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad601>
- Thomas, A. L., Guerreiro, S. M. C., & Sodek, L. (2005). Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. *Annals of Botany*, 96(7), 1191-1198. <https://doi.org/10.1093/aob/mci272>
- Thomey, M. L., Slattery, R. A., Köhler, I. H., Bernacchi, C. J., & Ort, D. R. (2019). Yield response of field-grown soybean exposed to heat waves under current and elevated [CO₂]. *Global Change Biology*, 25(12), 4352-4368. <https://doi.org/10.1111/gcb.14796>
- Tien TM, Gaskins MH, Hubbell D (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. <https://doi.org/10.1128/AEM.37.5.1016-1024.1979>
- Upreti, D. C., Sen, S., & Dwivedi, N. (2010). Rising atmospheric carbon dioxide on grain quality in crop plants. *Physiology and molecular biology of plants*, 16, 215-227. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0029-3>
- van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 345-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114813>
- Vergara, C., Araujo, K. E. C., Souza, S. R. D., Schultz, N., Saggin Júnior, O. J., Sperandio,

M. V. L., & Zilli, J. É. (2018). Interação da planta com fungo micorrízico e sua resposta à inoculação com diferentes fungos promotores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 54, e25140. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.25140>

Verma, D. K., Kaur, B., Pandey, A. K., & Asthir, B. (2019). Nitrogenase: A Key Enzyme in Microbial Nitrogen Fixation for Soil Health. In *Microbiology for Sustainable Agriculture, Soil Health, and Environmental Protection* (pp. 261-294). Apple Academic Press.

Verma, M., Mishra, J., Arora, N.K. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications. In: Sobti, R., Arora, N., Kothari, R. (eds) *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_6

Vital, R. G., Müller, C., Freire, F. B. S., Silva, F. B., Batista, P. F., Fuentes, D., ... & Costa, A. C. (2022). Metabolic, physiological and anatomical responses of soybean plants under water deficit and high temperature condition. *Scientific Reports*, 12(1), 16467. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21035-4>

Vital, R. G., Müller, C., Freire, F. B. S., Silva, F. B., Batista, P. F., Fuentes, D., ... & Costa, A. C. (2022). Metabolic, physiological and anatomical responses of soybean plants under water deficit and high temperature condition. *Scientific Reports*, 12(1), 16467. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21035-4>

Vitor, S. C., & Sodek, L. (2019). Products of anaerobic metabolism in waterlogged roots of soybean are exported in the xylem. *Plant science*, 284, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.023>

von Caemmerer, S., & Furbank, R. T. (2003). The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. *Photosynthesis research*, 77, 191-207. <https://doi.org/10.1023/A:1025830019591>

Wang, M., Xie, B., Fu, Y., Dong, C., Hui, L., Guanghui, L., and Liu, H., (2015). Effects of different elevated CO₂ concentrations on chlorophyll contents, gas exchange, water use efficiency, and PSII activity on C₃ and C₄ cereal crops in a closed artificial ecosystem, *Photosynth. Res.*, vol. 126, p. 351. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0134-9>

Wang, X., & Komatsu, S. (2020). Proteomic techniques for the development of flood-tolerant soybean. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7497. <https://doi.org/10.3390/ijms21207497>

Watanabe, C. K., Sato, S., Yanagisawa, S., Uesono, Y., Terashima, I., and Noguchi, K. (2014). Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol.* 55, 341–357. doi: 10.1093/pcp/pct185

Wieser, H., Manderscheid, R., Erbs, M., & Weigel, H. J. (2008). Effects of elevated atmospheric CO₂ concentrations on the quantitative protein composition of wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6531-6535. <https://doi.org/10.1021/jf8008603>

Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, 21(9), 881-891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x>

Xu, Z., Jiang, Y., & Zhou, G. (2015). Response and adaptation of photosynthesis, respiration,

and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 701. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00701>

Yamauchi, T., Colmer, T. D., Pedersen, O., & Nakazono, M. (2018). Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant physiology*, 176(2), 1118-1130. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01157>

Zabalza A, Van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmalzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, Geigenberger P (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* 149: 1087–1098 <https://doi.org/10.1104/pp.108.129288>

Zeffa DM, Fantin LH, Koltun A, de Oliveira ALM, Nunes MPBA, Canteri MG, Gonçalves LSA. (2020). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ* 8:e7905 <https://doi.org/10.7717/peerj.7905>

Zhang, Y., Burris, R. H., Ludden, P. W., & Roberts, G. P. (1997). Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 195-204. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10428.x>

Zheng, Y., Li, F., Hao, L., Yu, J., Guo, L., Zhou, H., Ma, C., Zhang, X., and Xu, M., (2019). Elevated CO₂ concentration induces photosynthetic down-regulation with changes in leaf structure, non-structural carbohydrates and nitrogen content of soybean, *BMC Plant Biol.*, vol. 19, p. 255. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1788-9>

Zinta, G., Abdelgawad, H., Domagalska, M. A., Vergauwen, L., Knapen, D., Nijs, I., et al. (2014). Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels. *Global Change Biol.* 20, 3670–3685. doi: 10.1111/gcb.12626

HIPÓTESE

Plantas de soja quando coinoculadas e cultivadas em ambientes de elevado CO₂, apresentarão maior eficiência nos metabolismos do carbono e nitrogênio, culminando em um maior nível de tolerância ao alagamento.

OBJETIVO

Elucidar alterações no metabolismo do carbono e nitrogênio de plantas de soja coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e *Rhizophagus intraradices* submetidas a condições de alagamento em ambientes enriquecidos com CO₂.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da co-inoculação com *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e/ou *Rhizophagus* na assimilação de carbono, condutância estomática e transpiração em plantas de soja submetidas ao alagamento e elevado CO₂;

Avaliar o metabolismo fermentativo por meio da atividade das enzimas lactato desidrogenase, piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase e alanina aminotransferase em raízes de plantas co-inoculadas submetidas ao alagamento e elevado CO₂;

Avaliar o estresse oxidativo e o sistema antioxidante por meio da quantificação dos teores de H₂O₂, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase em raízes e folhas durante e após a exposição de plantas de soja ao alagamento, inoculadas com *Bradyrhizobium* e co-inoculadas com *Azospirillum* e/ou *Rhizophagus* em ambientes enriquecidos com CO₂;

Avaliar a influência da co-inoculação na recuperação das plantas após um período de alagamento em condições elevadas de CO₂ quanto aos teores de pigmentos fotossintéticos, carboidratos, H₂O₂, TBARS, aminoácidos, ureídeos e ácidos orgânicos, trocas gasosas foliares e metabolismo fermentativo;

Verificar a influência do alagamento no metabolismo fotorrespiratório de plantas coinoculadas cultivadas em elevado CO₂;

Determinar a interferência da coinoculação de *Azospirillum* via parte aérea em plantas inicialmente inoculadas com *Bradyrhizobium* quando submetidas ao alagamento;

Determinar se a coinoculação com *Azospirillum* influencia na atividade das enzimas relacionadas a fotorrespiração (glicolato oxidase) e metabolismo do nitrogênio (glutamina sintetase e glutamato sintase) em plantas de soja submetidas ao alagamento e elevado CO₂.



Article

CAPÍTULO I - Co-inoculation of soybean seeds with *azospirillum* and/or *rhizophagus* mitigates the deleterious effects of waterlogging in plants under enhanced CO₂ concentrations

Eduardo Pereira Shimoia ^{1,*}, Douglas Antônio Posso ^{1,*}, Cristiane Jovelina da-Silva ², Adriano Udich Bester ¹, Nathalia Dalla Corte Bernardi ¹, Ivan Ricardo Carvalho ³, Ana Cláudia Barneche de Oliveira ⁴, Luis Antonio de Avila ⁵ and Luciano do Amarante ¹

¹ Botanic Department, Federal University of Pelotas, Capão do Leão 96010-610, RS, Brazil; adriano.udich.bester@gmail.com (A.U.B.); nathaliadcbernardi@gmail.com (N.D.C.B.); lucianoamarante@yahoo.com.br (L.d.A.)

² Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA; cjdasilv@ncsu.edu

³ Department of Agricultural Studies, Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul, Ijuí 98700-000, RS, Brazil; carvalho.irc@gmail.com

⁴ Embrapa Temperate Agriculture, Brazilian Agricultural Research Corporation, Pelotas 96010-971, RS, Brazil; ana.barneche@embrapa.br

⁵ Department of Plant Soil Sciences, Mississippi State University, Starkville, MS 39762, USA; luis.avila@pss.msstate.edu

* Correspondence: eduardopshimoia@gmail.com (E.P.S.); douglasposso@hotmail.com (D.A.P.); Tel.: +55-53981034124 (D.A.P.)

Abstract: Rising CO₂ levels, as predicted by global climate models, are altering environmental factors such as the water cycle, leading to soil waterlogging and reduced oxygen availability for plant roots. These conditions result in decreased energy production, increased fermentative metabolism, impaired nutrient uptake, reduced nitrogen fixation, and altered leaf gas exchanges, ultimately reducing crop productivity. Co-inoculation techniques involving multiple plant growth-promoting bacteria or arbuscular mycorrhizal fungi have shown promise in enhancing plant resilience to stress by improving nutrient uptake, biomass production, and nitrogen fixation. This study aimed to investigate carbon and nitrogen metabolism adaptations in soybean plants co-inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Azospirillum brasilense*, and *Rhizophagus intraradices* under waterlogged conditions in CO₂-enriched environments. Plants were grown in pots in open-top chambers at ambient CO₂ concentration (*a*[CO₂]) and elevated CO₂ concentration (*e*[CO₂]). After reaching the V5 growth stage, the plants were subjected to waterlogging for seven days, followed by a four-day reoxygenation period. The results showed that plants' co-inoculation under *e*[CO₂] mitigated the adverse effects of waterlogging. Notably, plants inoculated solely with *B. elkanii* under *e*[CO₂] displayed results similar to co-inoculated plants under *a*[CO₂], suggesting that co-inoculation effectively mitigates the waterlogging stress, with plant physiological traits comparable to those observed under elevated CO₂ conditions.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; climate changes; diazotrophic bacteria; *Glycine max* (L.) Merrill; hypoxia; nitrogen support



Citation: Shimoia, E.P.; Posso, D.A.; da-Silva, C.J.; Bester, A.U.; Bernardi, N.D.C.; Carvalho, I.R.; de Oliveira, A.C.B.; Avila, L.A.d.; do Amarante, L. Co-Inoculation of Soybean Seeds with *Azospirillum* and/or *Rhizophagus* Mitigates the Deleterious Effects of Waterlogging in Plants under Enhanced CO₂ Concentrations. *Nitrogen* **2024**, *5*, 941–976. <https://doi.org/10.3390/nitrogen5040061>

Received: 30 August 2024

Revised: 27 September 2024

Accepted: 3 October 2024

Published: 15 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Global climate change, driven by anthropogenic and natural factors, is a widely studied topic due to its direct and indirect impacts on terrestrial ecosystems. Among the most examined aspects are temperature fluctuations and the increasing emission of greenhouse gases, particularly carbon dioxide (CO₂). Since the Industrial Revolution, atmospheric CO₂ levels have risen exponentially, with the most severe global carbon

emission scenarios observed in recent years [1]. As of July 2023, the atmospheric CO₂ concentration was recorded at 417.1 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ at the Mauna Loa Observatory in the USA. In 2005, a study projected that CO₂ levels could double by 2100, from 400 to 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [2].

Plants use atmospheric CO₂ for carbon fixation during photosynthesis. While a significant amount of atmospheric carbon is sequestered by algae and plankton in oceans, carbon cycling in terrestrial plants plays a crucial role, regardless of the type of carbon fixation pathway (C3, C4, or CAM). However, elevated CO₂ levels can lead to plant morphological and physiological changes [3,4]. C3 plants are more responsive to higher atmospheric CO₂, showing greater biomass accumulation than C4 plants [2,5,6]. This biomass increase in C3 plants often translates into enhanced productivity, though this response tends to plateau at CO₂ concentrations of around 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [3,7].

Despite the direct relationship between atmospheric CO₂ and biomass increase in C3 plants, growth is often limited by other factors such as water and nutrient availability, particularly nitrogen, which plays a key role in many physiological processes [8–10]. Many C3 plants—especially those in the Fabaceae family, like soybeans—form symbiotic relationships with diazotrophic bacteria to enhance nitrogen absorption and assimilation. This symbiosis helps minimize nitrogen deficiency and optimize the benefits of elevated CO₂ [11,12]. At higher CO₂ concentrations, plants provide more sugars to bacteria in the nodules, thereby boosting nitrogen fixation and increasing nitrogen supply to the plant [13–15]. However, even plants that form symbiotic relationships with N₂-fixing bacteria may experience limitations in productivity due to the availability of other essential nutrients, such as phosphorus, potassium, magnesium, and molybdenum in the soil [12,16–18]. To address this, co-inoculation practices using multiple diazotrophic bacteria, such as *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*, have been shown to enhance nutrient uptake in plants. These bacteria increase root surface area and N₂ fixation, thereby improving plant nutrient absorption and growth, known as plant growth-promoting bacteria (PGPB) [19].

Additionally, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), such as *Rhizophagus intraradices*, also contribute to improved plant growth by enhancing nutrient uptake, particularly phosphorus and nitrogen, and promoting better root development [20,21]. AMF also plays a key role in soil carbon mobilization. Under elevated CO₂ conditions, the diversity and abundance of soil microbial communities, including AMF, tend to increase [22]. As a result, co-inoculation strategies could be even more effective for improving soybean growth under elevated CO₂.

Due to climate change and increasing atmospheric CO₂, approximately 17 million km² of land globally are now subject to waterlogging events. Under waterlogged conditions, plants experience metabolic changes due to reduced oxygen availability in the roots [23]. Hypoxia leads to decreased biological nitrogen fixation and photosynthesis, resulting in lower carbohydrate and sugar production, ultimately reducing plant biomass [24,25].

Under normoxic conditions, plants exposed to elevated CO₂ or co-inoculated with multiple PGPB often show increases in nodule number, nodule weight, N₂ fixation per unit weight, and earlier nodulation [12,16,20,26–28]. However, the effects of elevated CO₂ and co-inoculation with diazotrophic bacteria and AMF under root hypoxia caused by waterlogging remain unclear. Therefore, this study aims to elucidate the adaptations in carbon and nitrogen metabolism in soybean plants co-inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, and/or *Rhizophagus intraradices* under waterlogged conditions in a CO₂-enriched environment.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material, Growth Conditions, and Treatments

Soybean seeds of the PEL BR 157060 cultivar, which is sensitive to waterlogging, were provided by the EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation, Pelotas, RS, Brazil) breeding program. The seeds were sterilized with 80% ethanol for two minutes, followed by 10% (*w/v*) sodium hypochlorite for two minutes, then rinsed with five minutes of sterilized water. After sterilization, the seeds were inoculated or co-inoculated with microorganisms, as in Table 1.

Table 1. Seed inoculation and co-inoculation treatments information.

Treatment	Abbreviation	Microorganisms *		
		<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019 and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079	<i>Azospirillum brasilense</i> Strains Ab-V5 and Ab-V6	<i>Rhizophagus intraradices</i> ROOTELLA BR® (Joinville, SC, Brazil)
<i>Bradyrhizobium</i> Inoculation	IB	4 mL seeds kg ⁻¹ with 5 × 10 ⁹ CFU mL ⁻¹	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> + <i>Azospirillum</i> Co-Inoculation	CA	4 mL seeds kg ⁻¹ with 5 × 10 ⁹ CFU mL ⁻¹	2 mL seeds kg ⁻¹ with 2 × 10 ⁸ CFU mL ⁻¹	-
<i>Bradyrhizobium</i> + <i>Rhizophagus</i> Co-Inoculation	CR	4 mL seeds kg ⁻¹ with 5 × 10 ⁹ CFU mL ⁻¹	-	1.35 g seeds kg ⁻¹ with 20,800 propagules g ⁻¹
<i>Bradyrhizobium</i> + <i>Azospirillum</i> + <i>Rhizophagus</i>	CAR	4 mL seeds kg ⁻¹ with 5 × 10 ⁹ CFU mL ⁻¹	2 mL seeds kg ⁻¹ with 2 × 10 ⁸ CFU mL ⁻¹	1.35 g seeds kg ⁻¹ with 20,800 propagules g ⁻¹

* All microorganism doses were applied as recommended to avoid competition between them. CFU: colony forming unit.

Sixty minutes after the inoculation or co-inoculation process, five seeds were planted per pot and placed in two open-top chambers (OTCs). One chamber maintained ambient CO₂ levels (*a*[CO₂], 400 μmol mol⁻¹) without a gas injection system, while the other chamber was regulated to maintain a CO₂ level of 700 μmol mol⁻¹ (*e*[CO₂]), as shown in Figure S1. One-liter pots, filled with soil typical of lowland regions (soil collection site: 31°48'26.21'' S; 52°28'48.20'' W), were sterilized in an autoclave (127 °C; 1.5 ATM; 1 h 30 min) and amended to meet the nutritional demands for high soybean productivity, following the *Fertilization and Liming Manual*. The soil's chemical characteristics are described in Table S1. After the unifoliate leaf pair emerged and developed, thinning was performed to leave only three plants per pot. When the plants reached the V4 phenological stage (five nodes and four trefoils), they were subjected to waterlogging for seven days, followed by four-day reoxygenation. During the waterlogging treatment, the four replicates of each treatment were placed in a larger container with a water layer approximately seven centimeters above the soil. For reoxygenation, the pots were removed from the containers and allowed to drain naturally (Figure 1). Data collection occurred twice: once at the end of the waterlogging period and again at the end of the reoxygenation period. Biometric analyses were conducted on each sampling day, and the material for biochemical analyses was stored in an ultra-freezer at −80 °C.

Temperature, humidity, and CO₂ levels within the OTCs (Figure S1) were monitored throughout the experiment at three-minute intervals. Daily averages between 6:30 and 19:30 generated the graphs shown in Figure S1, excluding periods when the plants were not photosynthetically active (night).



Figure 1 Schematic representation of the treatments and experimental design. Soybean plants were cultivated under different CO₂ concentrations (ambient $a[\text{CO}_2]$ or elevated $e[\text{CO}_2]$) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) and subsequent reoxygenation (four days). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

2.2. Gas Exchange, Plant Growth, Biomass Accumulation, and Total Chlorophyll Content

Gas exchange was measured in intact young leaves (the first fully expanded trefoil) using a portable infrared CO₂ analyzer (model LI-6400XT, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) at the end of both the waterlogging and reoxygenation periods. Measurements were taken between 8 and 10 a.m., with the CO₂ concentration in the chamber set at either 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ or 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, and a photon flux density of 1250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, using the LI-COR 6400-02B (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) light source attached to the measurement chamber (2 × 3 cm) with block temperature control set at 25 °C.

At the end of the waterlogging and subsequent reoxygenation periods, the following biometric parameters were evaluated: (I) leaf area (LA), measured using the formula $LA = 2.0185 \times (L \times W)$, where L is the maximum leaf length and W is the maximum leaf width [29]; (II) stem diameter (SD), measured with a digital caliper at the stem base just above the substrate; (III) root fresh weight (RFW); (IV) root volume (RV), measured by water displacement in a graduated cylinder; and (V) shoot dry weight (SDW), determined after drying in an oven at 65 °C until a constant weight was achieved.

To extract chlorophyll *a*, *b*, and carotenoid levels, 0.020 g of the youngest fully expanded trefoil was combined with 5 mL of dimethyl sulfoxide. The sample and reagent were incubated in a water bath at 65 °C for one hour, after which absorbance readings at 480, 649, and 665 nm were taken using a spectrophotometer to calculate and express the results in $\mu\text{g g}^{-1}$ [30].

2.3. Hydrogen Peroxide Levels, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Enzyme Activity

Leaves and roots (0.250 g) were ground in liquid nitrogen, homogenized with 0.1% (*w/v*) trichloroacetic acid, and then centrifuged at $13,000 \times g$ at 4 °C for 20 min. The H₂O₂ content was determined following the methodology of Velikova et al. [31]. The extent of lipid peroxidation in the samples was assessed by determining malondialdehyde (MDA) content using thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), following the method of Cakmak and Horst [32], utilizing the same extract obtained previously for H₂O₂ analysis. The activities of antioxidant enzymes were determined in leaves and roots from 0.250 g samples. The samples were ground with liquid nitrogen and homogenized with 2 mL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 100 μM EDTA, 10 mM ascorbic acid, and 25% (*w/w*) polyvinylpyrrolidone (PVPP). The extracts were centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatants were used as crude enzyme extracts. Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assessed using the methodology described by Giannopolitis and Ries [33]. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assessed according to Azevedo et al. [34]. Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity was evaluated in a reaction mixture as detailed by Nakano and Asada [35].

2.4. Fermentative Enzymes and Ala-AT

Root samples (0.300 g) were ground with liquid nitrogen and homogenized in 2 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and 25% (*w/w*) PVPP. The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatant was desalted using a PD-10 column (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). After protein elution, aliquots were used to determine the activities of pyruvate decarboxylase (PDC; EC 4.1.1.17), lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.17), alcohol dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1), and alanine aminotransferase (Ala-AT; EC 2.6.1.2). Enzyme activities were measured by monitoring NADH oxidation at 340 nm. The activities of ADH and PDC were assessed following the method proposed by Hanson et al. [36]. LDH activity was measured according to the method described by Hanson and Jacobsen [37]. The Ala-AT assay was conducted as described by Good and Muench [38].

2.5. Total Soluble Sugar Content

The extraction of total soluble sugars (TSS) from 0.5 g of root samples followed the method of Bielecki and Turner [39], using an extraction solution composed of methanol, chloroform, and water in a 12:5:3 ratio. The TSS content was determined using the method of Graham and Smydzuk [40], where 0.15% (*w/v*) anthrone in sulfuric acid was used, and absorbance readings were taken at 620 nm. TSS levels were determined based on a glucose calibration curve with concentrations ranging from 0 to 150 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

2.6. Experimental Design and Statistical Analyses

The pots were arranged in two growth chambers (OTCs) in a completely randomized experiment. Each pot contained three plants, which together formed an experimental unit, and each treatment consisted of four replications. A control group was established for both waterlogged and reoxygenated plants. The experiment was analyzed using a three-factor design: Factor 1 represented CO₂ levels (ambient CO₂ [*a*(CO₂)] or enriched CO₂ [*e*(CO₂)]); Factor 2 represented water treatments (control or waterlogging/reoxygenation); and Factor 3 represented co-inoculation treatments (IB, CA, CR, and CAR).

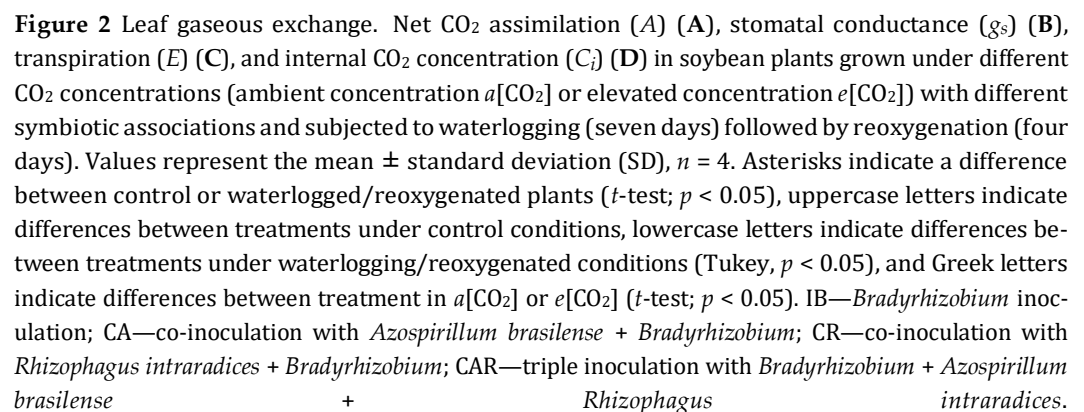
Statistical analysis was performed using Rbio software version 191. The data were checked for normality and homogeneity before performing a three-way analysis of variance (ANOVA). When significant differences were detected via the F-test in ANOVA, the data were compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). Graphs were created using SigmaPlot 12 software. Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) graphs were constructed using the Metaboanalyst tool (<https://metaboanalyst.ca/>; Quebec, Canada)

3. Results

3.1. Effect of *e*[CO₂] and Co-Inoculation on Gas Exchange and Photosynthetic Pigments

Regarding CO₂ assimilation (*A*; Figure 2A), all plants subjected to waterlogging for seven days exhibited a reduction in *A*, regardless of the environment (ambient CO₂ [*a*(CO₂)] or enriched CO₂ [*e*(CO₂)]). However, plants grown under *e*[CO₂] displayed higher *A* rates. On average, in *a*[CO₂] conditions, waterlogged plants reduced their *A* by 11% compared to control plants, while this difference decreased to 2.5% for plants grown under *e*[CO₂]. The results also indicated differences among microbiological treatments; plants co-inoculated with CA, CR, and CAR exhibited less reduction in *A* compared to plants solely inoculated with *Bradyrhizobium* (IB treatment).

In the IB treatment under hydric control conditions in *a*[CO₂], plants showed 1.2 times less *A* than those in CA, CR, and CAR treatments. When comparing waterlogged plants, this difference increased to 34%, with CA, CR, and CAR plants demonstrating higher *A* rates. Plants grown under *e*[CO₂] from CA, CR, and CAR hydric control conditions exhibited 17% more *A* than IB plants. The difference between IB and CA, CR, and CAR plants increased to 57% for waterlogged plants. During reoxygenation, plants grown under *a*[CO₂] showed smaller differences between their respective treatments under control conditions, with a 29% lower *A* in reoxygenated plants. Among microbiological treatments, control plants in the IB treatment had, on average, 37% less *A* than those in CA, CR, and CAR treatments, with 30% higher results observed during reoxygenation in co-inoculated plants. Under *e*[CO₂] conditions, reoxygenated plants exhibited improved results, with an average reduction in *A* of 24% compared to their respective control plants, and the differences among microbiological treatments were also smaller. Reoxygenated IB plants had 15% lower *A* than control plants in the CA, CR, and CAR treatments, while reoxygenated CA, CR, and CAR plants had 29% higher *A* than IB plants under *e*[CO₂].



Stomatal conductance (g_s ; Figure 2B) mirrored the results for A , as waterlogged plants exhibited reduced g_s , regardless of the environment ($a[CO_2]$ or $e[CO_2]$) or microbiological treatment. Notably, control plants grown under $e[CO_2]$ had, on average, 27% lower g_s compared to those grown under $a[CO_2]$ and 33% lower in waterlogged plants. Regarding microbiological treatments, CA, CR, and CAR plants grown under $a[CO_2]$ and subjected to waterlogging exhibited 90% higher g_s than IB plants. In the $e[CO_2]$ environment, the difference in g_s between waterlogged IB and CA, CR, and CAR plants was 41%, with a 14% difference among their respective control plants. During the reoxygenation period, g_s of plants grown in $a[CO_2]$ remained below their respective controls, with an average difference of 33%. Microbiological treatments CA, CR, and CAR had 76% higher g_s than IB plants, while control plants showed a smaller difference of 19%. Under $e[CO_2]$ conditions, no differences were found between control or reoxygenated plants or among microbiological treatments, indicating that under $e[CO_2]$, plants possess a better recovery capacity due to their metabolic condition before and during waterlogging stress.

Regardless of CO_2 level, plants reduced transpiration rate (E) during waterlogging (Figure 2C). Plants grown in $a[CO_2]$ and subjected to waterlogging for seven days exhibited an average reduction in E of 52% compared to control plants. Under $e[CO_2]$ conditions, waterlogged plants showed a reduction of 45% in E compared to their controls. The difference in E between IB and CA, CR, and CAR plants was smaller in $a[CO_2]$ (6%) compared to the 9% difference found in $e[CO_2]$ plants. During reoxygenation, the difference in E between reoxygenated and control plants was 20% for $a[CO_2]$ conditions, while for $e[CO_2]$ plants, the difference was 11%. Differences between IB and CA, CR, and CAR plants during reoxygenation varied, with a greater difference observed in $a[CO_2]$ (64%) compared to only 6% in $e[CO_2]$ plants.

As expected, soybean plants grown under $e[CO_2]$ conditions exhibited an average increase in internal CO_2 concentration (C_i) of 90% compared to those grown under $a[CO_2]$ (Figure 2D). Waterlogged plants grown in $a[CO_2]$ conditions showed a reduction in C_i of 4%, with statistical differences between waterlogged and control plants observed only in the IB and CAR treatments. Under $e[CO_2]$, this reduction increased to 6%, with C_i decreasing for all microbiological treatments during waterlogging. During the reoxygenation period, only the difference between $a[CO_2]$ and $e[CO_2]$ remained, with no significant differences observed between reoxygenated and control plants or among microbiological treatments. All treatments under reoxygenation conditions reached C_i values similar to their respective controls, indicating that plants under $e[CO_2]$ exhibit enhanced photosynthetic capacity to cope with stress.

Photosynthetic pigments are presented in Figure 3A–D. Although there was no clear response pattern to waterlogging or CO_2 levels, the main results are highlighted. Control co-inoculated plants grown under $a[CO_2]$ had lower chlorophyll a (Chlo_ a) content compared to IB plants in the same environment (Figure 3A). Additionally, under $a[CO_2]$, waterlogged IB and CA treatments exhibited reduced Chlo_ a content, while CR and CAR treatments maintained similar pigment levels to their respective controls. In $e[CO_2]$ conditions, the Chlo_ a content among control treatments did not differ between IB and co-inoculated plants (CA, CR, and CAR). Both IB and CA plants reduced Chlo_ a during waterlogging in this environment, while CR and CAR maintained Chlo_ a levels like those of their control plants. During the reoxygenation period in $a[CO_2]$, IB and CA treatments did not differ from their control plants; however, CR and CAR treatments reduced Chlo_ a content to half of that presented by their control plants. Under $e[CO_2]$, IB and CAR treatments maintained Chlo_ a levels similar to their control plants during reoxygenation, while CA and CR plants reduced their Chlo_ a content by 50%.

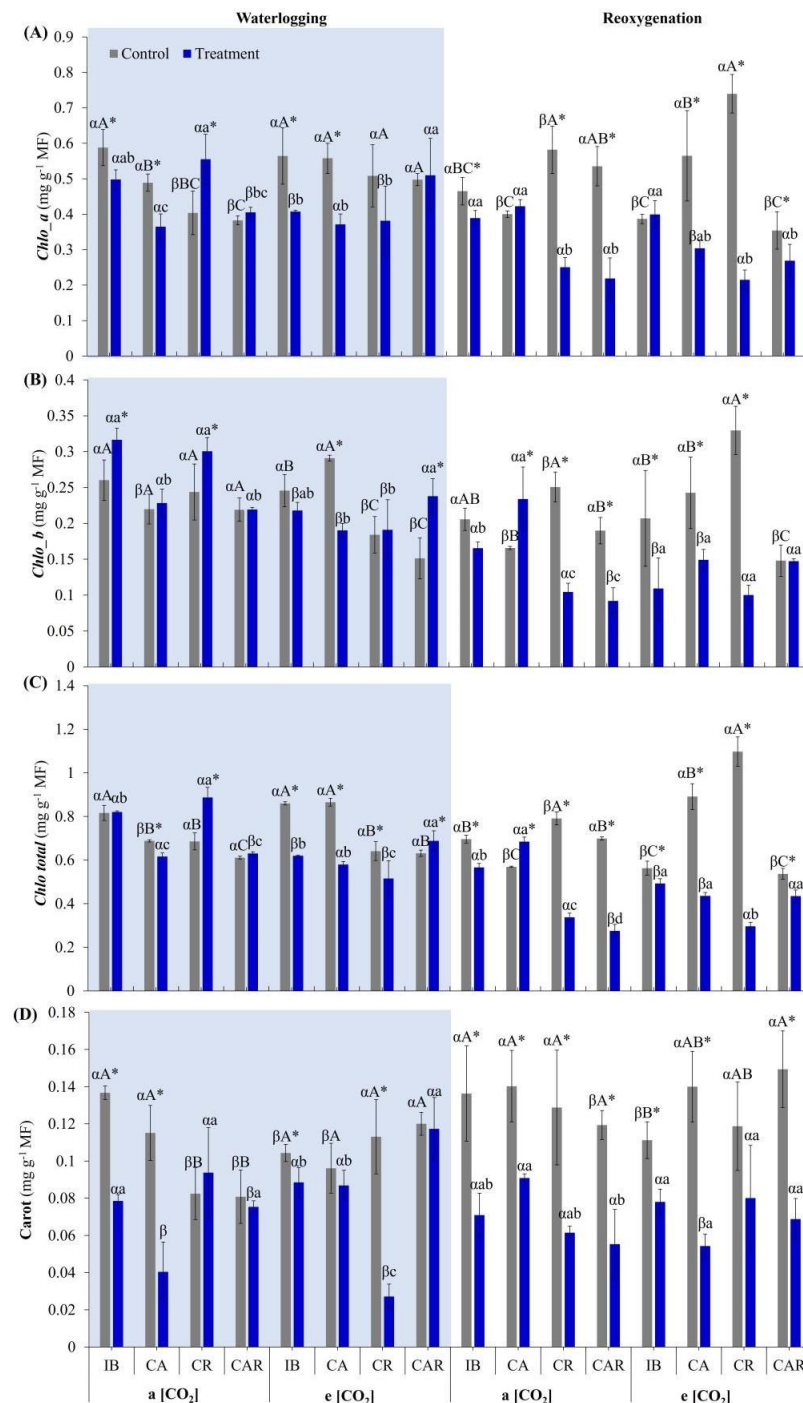


Figure 3 Pigment content. Chlorophyll *a* content (Chlo_*a*) (A), chlorophyll *b* (Chlo_*b*) (B), total chlorophyll (Chlo-total) (C), and carotenoids (Carot) (D) in soybean plants grown under different CO₂ concentrations [ambient concentration *a*[CO₂] or elevated concentration *e*[CO₂]] with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean ± SD, *n* = 4. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (*t*-test; *p* < 0.05), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, *p* < 0.05), and Greek letters indicate differences between treatment in *a*[CO₂] or *e*[CO₂] (*t*-test; *p* < 0.05). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizopagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizopagus intraradices*.

Chlorophyll *b* (Chlo_*b*) levels (Figure 3B) in plants grown under *a*[CO₂] did not decrease during waterlogging. Under *e*[CO₂], only the CA treatment exhibited reduced Chlo_*b* during waterlogging, while IB, CR, and CAR plants showed reduced Chlo_*b*. During reoxygenation in *a*[CO₂], only CA plants maintained their Chlo_*b* levels, while other microbiological treatments exhibited reductions. Under *e*[CO₂] during reoxygenation, only CAR plants maintained their Chlo_*b* levels. Additionally, among control treatments, CAR had the lowest Chlo_*b* content.

Total chlorophyll content (Figure 3C) was lower in control co-inoculated plants grown under *a*[CO₂]. Among waterlogged plants in this environment, only CA exhibited a slight reduction compared to its control. Under *e*[CO₂] conditions, unlike other treatments, only CAR plants did not show a reduction when waterlogged. During the reoxygenation process in *a*[CO₂], only the CA treatment did not reduce total chlorophyll content compared to its control plants. However, under *e*[CO₂], total chlorophyll content drastically decreased in CA and CR treatments, approximately 50% less than their controls, while IB and CAR treatments were less affected, with only about a 2% reduction compared to their controls. Carotenoid content (carot) (Figure 3D) in CR and CAR plants did not decrease during waterlogging under *a*[CO₂], whereas IB and CA treatments exhibited reductions of 40% and 70%, respectively, compared to their controls. Under *e*[CO₂], only the CR treatment showed a 70% reduction in carot during waterlogging. During reoxygenation, carot content decreased in all treatments, regardless of *a*[CO₂] or *e*[CO₂] conditions.

3.2. Effect of *e*[CO₂] and Co-Inoculation on H₂O₂ Production and Lipid Peroxidation

3.2.1. H₂O₂ Content and Lipid Peroxidation in Leaves

The production of H₂O₂ in leaves increased in plants subjected to a seven-day waterlogging period, regardless of CO₂ level or microbiological treatment (Figure 4A). Plants grown under *a*[CO₂] produced more H₂O₂ than those grown under *e*[CO₂], irrespective of hydric condition. The increase in H₂O₂ production in waterlogged plants compared to control plants was 43% higher under *a*[CO₂], while the increase in the *e*[CO₂] environment was 31% higher. Co-inoculated control plants from CA, CR, and CAR treatments produced 15% less H₂O₂ than solely inoculated IB plants, which decreased to a 9% reduction under waterlogging in *a*[CO₂] conditions. Under *e*[CO₂], the difference in H₂O₂ production between co-inoculated control plants from CA, CR, and CAR treatments and solely inoculated IB plants was 6%, and the difference in waterlogged plants was 9%. During the reoxygenation period, H₂O₂ levels in leaves tended to equalize with control plants; however, the difference between plants grown under *a*[CO₂] and *e*[CO₂] persisted. The difference between control and reoxygenated plants under *a*[CO₂] was 23%, while for plants grown under *e*[CO₂], it was 27%. Differences were also noted between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants, with a 10% difference in control and reoxygenated plants under *a*[CO₂]. This difference also occurred in the *e*[CO₂] environment, with a 5% difference among control plants and a 23% difference during reoxygenation.

Accompanying the increased H₂O₂ production during waterlogging, leaves also had greater lipid peroxidation, irrespective of CO₂ level or microbiological treatment (Figure 4B). In plants grown under *a*[CO₂], waterlogging increased malondialdehyde (MDA) content by 19%, while in *e*[CO₂] conditions, MDA levels increased by 13% compared to their respective control plants. Regardless of CO₂ level, differences were observed between solely inoculated IB plants and co-inoculated plants from CA, CR, and CAR treatments. The difference among control plants in the *a*[CO₂] environment was 11%, while in the *e*[CO₂] environment, it was 5%. When calculating the same ratio among waterlogged plants, co-inoculated plants exhibited lower MDA levels, with 20% and 11% reductions, respectively. During the reoxygenation process, MDA levels remained consistent between control and reoxygenated plants, regardless of CO₂ level or microbiological treatment. However, a small difference persisted between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants in the *a*[CO₂] environment, with a 12% difference for both control and

reoxygenated plants. In the $e[\text{CO}_2]$ environment, this difference was reduced to 5% for control and reoxygenated plants.

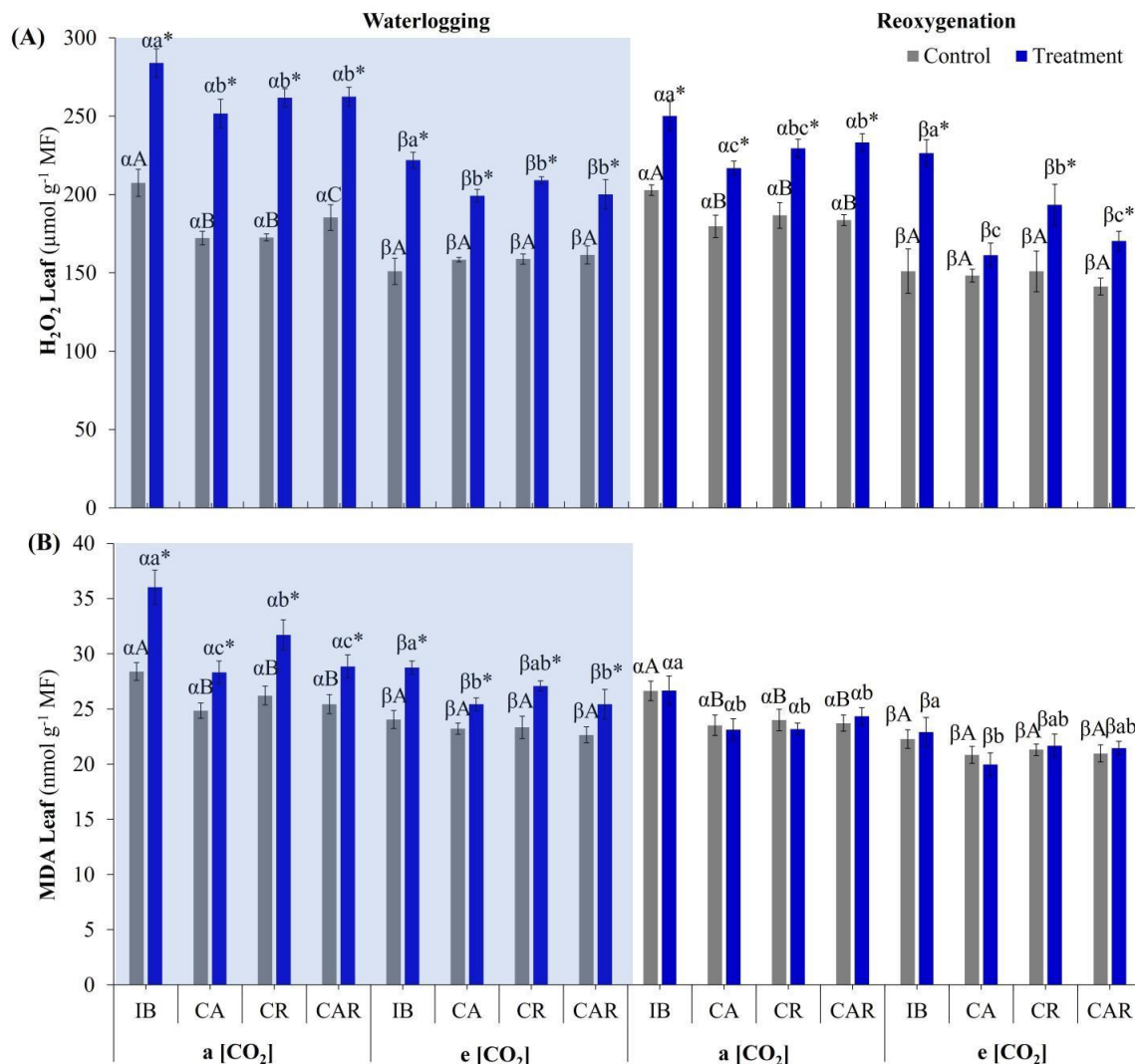


Figure 4. Peroxide content and lipid peroxidation in leaves. Accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) (A) and lipid peroxidation (MDA) (B) in leaves of soybean plants grown under different CO_2 concentrations (ambient concentration $a[\text{CO}_2]$ or elevated concentration $e[\text{CO}_2]$) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean $\pm$ SD, $n = 4$. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (t -test; $p < 0.05$), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, $p < 0.05$), and Greek letters indicate differences between treatment in $a[\text{CO}_2]$ or $e[\text{CO}_2]$ (t -test; $p < 0.05$). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

3.2.2. H_2O_2 Content and Lipid Peroxidation in Roots

During the waterlogging period, regardless of CO_2 level or microbiological treatment, roots exhibited increased levels of H_2O_2 (Figure 5A). On average, plants grown under $a[\text{CO}_2]$ during waterlogging showed a 17% increase in H_2O_2 production; a similar increase was observed in plants grown under $e[\text{CO}_2]$. Control IB plants grown under $a[\text{CO}_2]$ produced 17% more H_2O_2 than those from CA, CR, and CAR treatments. This difference

decreased to 15% when these plants were subjected to waterlogging. Control IB plants grown under $e[\text{CO}_2]$ had 12% more H_2O_2 than control plants from CA, CR, and CAR treatments, and this difference increased to 15% during waterlogging. During the reoxygenation period, the difference between reoxygenated and control plants in the $a[\text{CO}_2]$ environment was 43%, while under $e[\text{CO}_2]$, it was 31%. Regardless of CO_2 level, the difference between IB and CA, CR, and CAR plants was 15% among those maintained under control conditions, whereas the difference during reoxygenation was 12% and 10% for $a[\text{CO}_2]$ and $e[\text{CO}_2]$ environments, respectively. In addition to the increases observed during the seven days of waterlogging, the highest H_2O_2 levels in roots were recorded in reoxygenated plants.

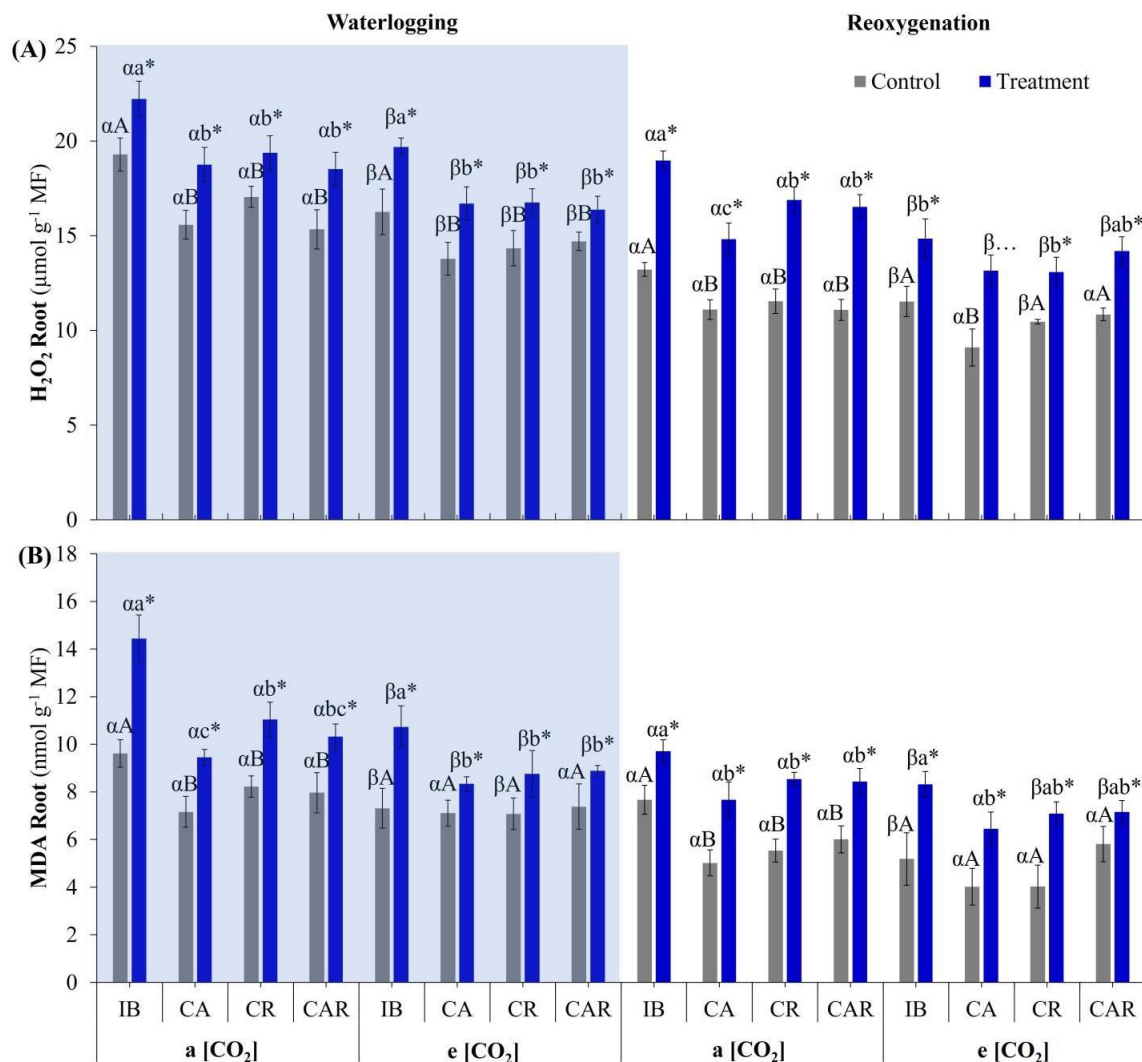


Figure 5. Peroxide content and lipid peroxidation in roots. Accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) (A) and lipid peroxidation (MDA) (B) in roots of soybean plants grown under different CO_2 concentrations (ambient concentration $a[\text{CO}_2]$ or elevated concentration $e[\text{CO}_2]$) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean $\pm$ SD, $n = 4$. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (t -test; $p < 0.05$), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, $p < 0.05$), and Greek letters indicate differences between treatment in $a[\text{CO}_2]$ or $e[\text{CO}_2]$ (t -test; $p < 0.05$). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizopagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizopagus intraradices*.

Lipid peroxidation in roots also increased during the waterlogging period, regardless of CO₂ level or microbiological treatment, but was intensified during the reoxygenation period (Figure 5B). Waterlogged plants grown under *a*[CO₂] exhibited a 37% increase in MDA concentration, while plants grown under *e*[CO₂] showed a 27% increase. The average difference in MDA concentration between IB and CA, CR, and CAR plants grown under *a*[CO₂] was 20%, whereas this difference decreased to only 2% under *e*[CO₂]. During waterlogging, the average difference between IB plants and those from CA, CR, and CAR treatments was 28% in the *a*[CO₂] environment and 11% in the *e*[CO₂] environment. During the reoxygenation period, MDA levels increased by 42% for plants grown under *a*[CO₂] and 53% for those grown under *e*[CO₂] compared to their respective control plants. Control IB plants under *a*[CO₂] during the reoxygenation period had 28% more MDA than CA, CR, and CAR treatment plants; this difference was 11% for plants grown under *e*[CO₂]. IB plants undergoing reoxygenation under *a*[CO₂] exhibited 15% more MDA than CA, CR, and CAR reoxygenated plants and a 17% increase when evaluated among plants grown under *e*[CO₂].

3.3. Effect of *e*[CO₂] and Co-Inoculation on Antioxidant Enzyme Activity

3.3.1. Antioxidant Enzyme System in Leaves

The antioxidant enzymatic system exhibited increased activity in leaves during the waterlogging period, regardless of CO₂ level or microbiological treatment, with greater activity observed in plants under *e*[CO₂] conditions (Figure 6). The activity of the SOD enzyme in leaves (Figure 6A) increased by 40% in waterlogged plants grown under *a*[CO₂]. In contrast, the increase was 53% for those grown under *e*[CO₂] compared to their respective control plants. Differences in SOD activity were also noted among microbiological treatments, with solely inoculated IB plants exhibiting lower SOD activity than co-inoculated CA, CR, and CAR plants, both in the *a*[CO₂] environment (19%) and the *e*[CO₂] environment (14%). During waterlogging, the difference between IB and CA, CR, and CAR plants was 18% for plants grown under *a*[CO₂] and 12% for those under *e*[CO₂]. The reoxygenation period was insufficient for SOD activity in reoxygenated plants to reach control levels, with reoxygenated plants grown under *a*[CO₂] showing 41% higher activity compared to control plants. Under *e*[CO₂], reoxygenated plants exhibited 38% higher SOD activity than their respective controls. Differences among microbiological treatments persisted during reoxygenation, with control IB plants showing 18% lower SOD activity compared to co-inoculated CA, CR, and CAR plants in the *a*[CO₂] environment and a 19% difference for reoxygenated plants. In the *e*[CO₂] environment, the difference between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants was 9% for control plants and 11% for reoxygenated plants.

The activity of the CAT enzyme in leaves also increased, showing a 26% rise in waterlogged plants under *a*[CO₂] and a 45% increase under *e*[CO₂] compared to their respective controls (Figure 6B). The difference between control IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants was 21% under *a*[CO₂] and 6% under *e*[CO₂]. After seven days of waterlogging, these differences increased to 22% for plants under *a*[CO₂] and 14% for those under *e*[CO₂]. During reoxygenation, the differences between control and reoxygenated plants were 17% for those grown under *a*[CO₂] and 21% for those under *e*[CO₂]. Control IB plants under *a*[CO₂] exhibited 25% lower CAT activity compared to co-inoculated CA, CR, and CAR plants, while the difference was 19% during reoxygenation. In the *e*[CO₂] environment, the difference between control IB plants and CA, CR, and CAR plants during waterlogging was 7%, increasing to 17% during reoxygenation.

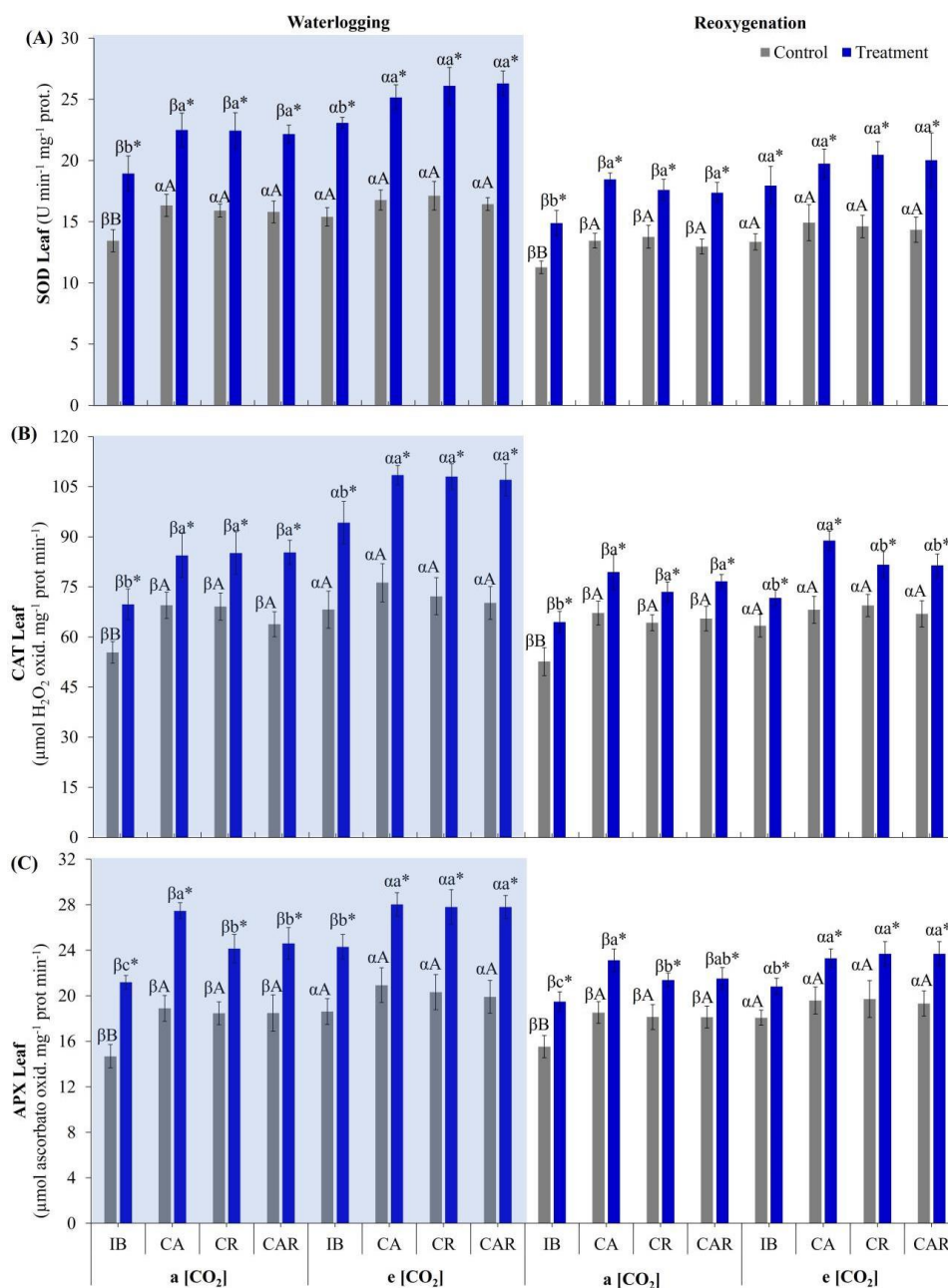


Figure 6. Antioxidant enzyme activity in leaves. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), and ascorbate peroxidase (APX) (C) in leaves of soybean plants grown under different CO₂ concentrations (ambient concentration a[CO₂] or elevated concentration e[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean ± SD, *n* = 4. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (*t*-test; *p* < 0.05), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, *p* < 0.05), and Greek letters indicate differences between treatment in a[CO₂] or e[CO₂] (*t*-test; *p* < 0.05). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

APX enzyme activity increased by 38% in waterlogged plants grown under a[CO₂] compared to their respective controls (Figure 6C). In plants grown under e[CO₂], this in-

crease due to waterlogging stress was 35%. Differences between microbiological treatments were also noted, with solely inoculated IB plants under $a[\text{CO}_2]$ exhibiting 27% lower APX activity than co-inoculated CA, CR, and CAR plants; this difference reduced to 10% for plants grown under $e[\text{CO}_2]$. During the reoxygenation period, differences decreased but remained significant, with APX activity in plants grown under $a[\text{CO}_2]$ being 21% higher than control plants and 19% higher in those grown under $e[\text{CO}_2]$. The difference between IB plants in control conditions grown under $a[\text{CO}_2]$ was 17% lower than co-inoculated CA, CR, and CAR plants, reducing this difference to 13% during reoxygenation. Evaluating control IB plants compared to control CA, CR, and CAR plants in the $e[\text{CO}_2]$ environment revealed an average difference of 8%, increasing to 13% during reoxygenation.

Notably, IB plants subjected to waterlogging under $a[\text{CO}_2]$ exhibited lower antioxidant activity than IB plants subjected to waterlogging under $e[\text{CO}_2]$. However, co-inoculated CA, CR, and CAR plants grown under $a[\text{CO}_2]$ showed antioxidant activity equivalent to that of IB treatment plants grown under $e[\text{CO}_2]$, indicating that co-inoculation enhances the antioxidant system in relation to increased CO_2 levels. This suggests these plants have a superior capacity to cope with stressful conditions.

3.3.2. Antioxidant Enzyme System in Roots

The antioxidant enzymatic system, including SOD, CAT, and APX, exhibited increased activity in roots during waterlogging, irrespective of microbiological treatment or CO_2 level (Figure 7). SOD activity in roots increased by 37% in waterlogged plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and by 46% in those grown under $e[\text{CO}_2]$, compared to control plants (Figure 7A). The average difference in SOD activity between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants was 32% for control plants in the $a[\text{CO}_2]$ environment but decreased to only 8% for plants grown under $e[\text{CO}_2]$. Under waterlogging conditions, the difference between IB and co-inoculated plants was 16% for $a[\text{CO}_2]$ and 13% for $e[\text{CO}_2]$. During the reoxygenation process, differences in SOD activity compared to control plants were 25% for $a[\text{CO}_2]$ and 17% for $e[\text{CO}_2]$. Notably, IB plants maintained higher SOD activity than co-inoculated plants, with a difference of 24% under $a[\text{CO}_2]$ and 6% under $e[\text{CO}_2]$ during reoxygenation. For reoxygenated plants, IB plants showed an 11% difference from CA, CR, and CAR plants under $a[\text{CO}_2]$ and a 9% difference under $e[\text{CO}_2]$. CAT activity increased by 24% in waterlogged plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and by 32% in those under $e[\text{CO}_2]$ compared to control plants (Figure 7B). Solely inoculated IB plants exhibited a 22% lower CAT activity than co-inoculated CA, CR, and CAR plants under control conditions in the $a[\text{CO}_2]$ environment, with no significant difference in the $e[\text{CO}_2]$ environment. During waterlogging, the difference in CAT activity between IB and co-inoculated plants was 11% under $a[\text{CO}_2]$ and 55% under $e[\text{CO}_2]$. During reoxygenation, CAT activity was 16% higher for plants under $a[\text{CO}_2]$ and 15% higher for those under $e[\text{CO}_2]$ than their respective controls. Differences persisted between control IB and co-inoculated plants, 18% for $a[\text{CO}_2]$ and 2% for $e[\text{CO}_2]$. Reoxygenated IB plants showed 7% lower CAT activity than co-inoculated plants in $a[\text{CO}_2]$ and 3% lower in $e[\text{CO}_2]$.

APX activity increased by 26% in waterlogged plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and by 91% in those under $e[\text{CO}_2]$ compared to control plants (Figure 7C). Differences in APX activity were noted between control IB and co-inoculated plants, with a difference of 18% under $a[\text{CO}_2]$ and 5% under $e[\text{CO}_2]$. Under waterlogging conditions, the difference between solely inoculated IB and co-inoculated plants decreased to 11% for $a[\text{CO}_2]$ and increased to 12% for $e[\text{CO}_2]$. APX activity was higher in reoxygenated plants during reoxygenation than in control plants, showing a 14% difference for $a[\text{CO}_2]$ and 17% for $e[\text{CO}_2]$. Co-inoculated CA, CR, and CAR plants in control conditions had 21% higher APX activity than solely inoculated IB plants under $a[\text{CO}_2]$, with this difference decreasing to 2% in the $e[\text{CO}_2]$ environment. Reoxygenated IB plants had APX activity 12% lower than co-inoculated plants under $a[\text{CO}_2]$, while for $e[\text{CO}_2]$, the average difference between IB and co-inoculated plants was 2% higher for co-inoculated plants.

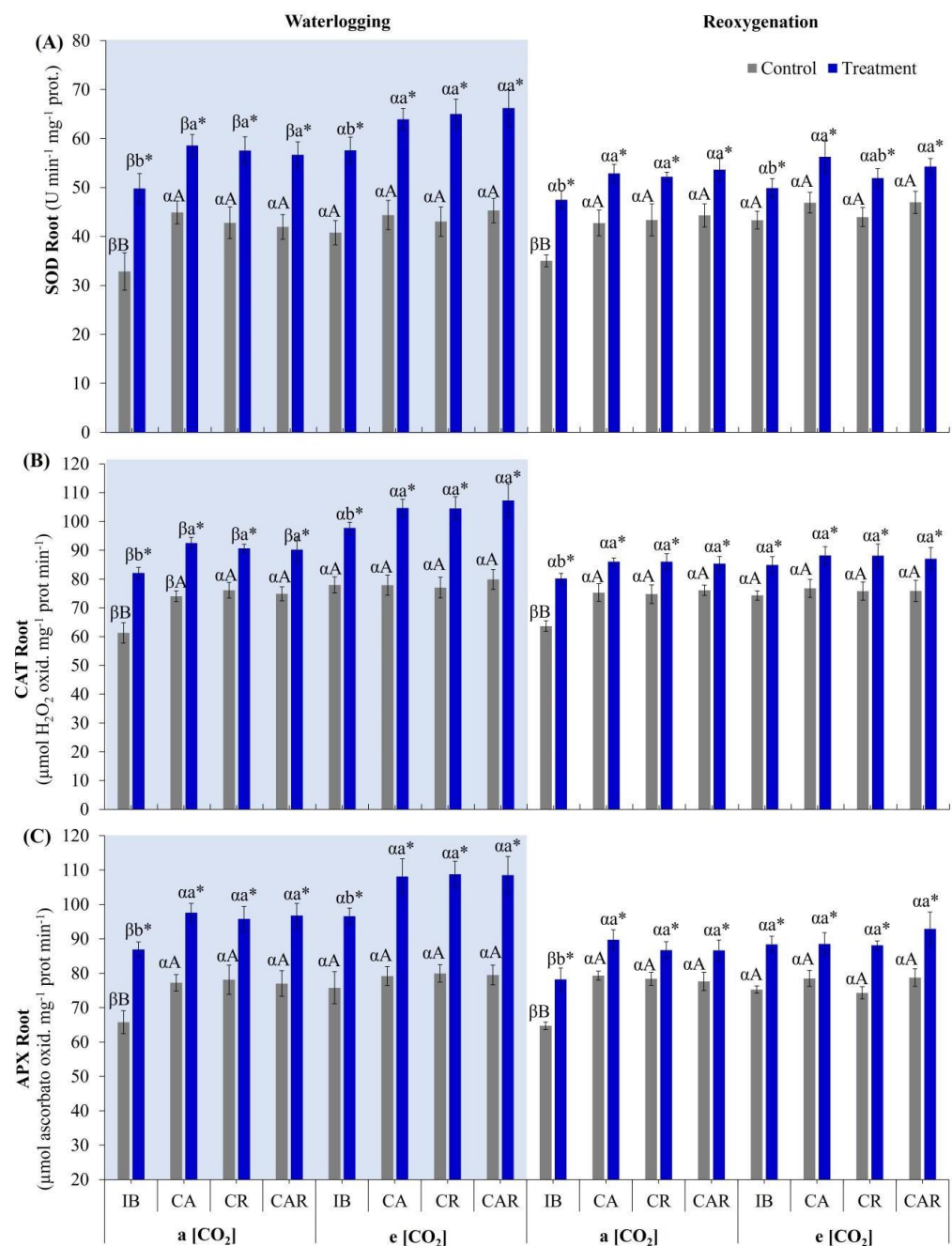


Figure 7. Antioxidant enzyme activity in roots. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), and ascorbate peroxidase (APX) (C) in roots of soybean plants grown under different CO₂ concentrations [ambient concentration a[CO₂] or elevated concentration e[CO₂]] with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by re-oxygenation (four days). Values represent the mean ± SD, n = 4. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (t-test; p < 0.05), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, p < 0.05), and Greek letters indicate differences between treatment in a[CO₂] or e[CO₂] (t-test; p < 0.05). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

Overall, the differences between control and waterlogged plants were greater during waterlogging than those observed when comparing control and reoxygenated plants. These differences varied according to CO₂ level and the specific enzyme (SOD, CAT, and APX) assessed, while the differences tended to be smaller during the reoxygenation period.

3.4. Effect of $e[CO_2]$ and Co-Inoculation on Fermentative Metabolism

Waterlogged plants exhibited increased fermentative metabolism in their roots, regardless of CO₂ level or microbiological treatment. The activities of lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate decarboxylase (PDC), alcohol dehydrogenase (ADH), and alanine aminotransferase (Ala-AT) were assessed, with activities found in control plants being negligible and primarily attributed to the experimental oxidation of NADH (Figure 8).

LDH activity was significantly lower in co-inoculated plants than solely inoculated IB plants, with reductions of 34% in CA and 68% in CAR plants under $a[CO_2]$, while CR plants showed no difference from IB plants (Figure 8A). In plants grown under $e[CO_2]$, LDH activity was more pronounced in ambient CO₂ conditions; however, CA and CAR plants displayed similar reductions in LDH activity (83% and 67%, respectively) compared to IB plants, with CR plants again showing no significant difference. During the reoxygenation period, $a[CO_2]$ plants still exhibited reduced LDH activity, except for CAR plants, which showed no detectable LDH activity. IB, CA, and CR plants exhibited LDH activity that did not differ significantly from each other.

PDC activity significantly increased due to waterlogging, irrespective of CO₂ levels (Figure 8B). Under $a[CO_2]$, co-inoculated treatments CA and CAR reduced PDC activity by 34% and 80%, respectively, compared to IB plants, while CR treatment did not differ from IB. In plants grown under $e[CO_2]$, PDC activity was markedly lower (by an average of 80%) than in those grown under $a[CO_2]$. Interestingly, CAR plants grown under $e[CO_2]$ exhibited a 120% increase in PDC activity compared to IB plants, while CA and CR plants showed no significant differences from IB. During reoxygenation, $a[CO_2]$ plants retained significant PDC activity, with CA, CR, and CAR treatments exhibiting 30%, 11%, and 74% lower activity, respectively, compared to IB plants with the highest activity. In $e[CO_2]$, PDC activity during reoxygenation was equivalent to control levels for all treatments except CR and IB.

ADH activity increased significantly in plants grown under $a[CO_2]$ during waterlogging; however, co-inoculated CA, CR, and CAR plants showed reduced ADH activity compared to IB plants, with reductions of 43%, 20%, and 29%, respectively (Figure 8C). Under $e[CO_2]$, the responses varied; CA plants had 26% lower ADH activity than IB, while CR plants exhibited a 100% increase, and CAR plants had a 20% increase in ADH activity compared to IB. During the reoxygenation period under $a[CO_2]$, IB plants maintained the highest ADH activity, with CA and CR treatments showing reductions of 50% and 56%, respectively, while CAR plants had no detectable ADH activity. In contrast, reoxygenated plants grown under $e[CO_2]$ revealed CR treatment exhibiting the highest ADH activity, approximately three times (206%) that of IB plants, with CA and CAR treatments showing no significant differences from IB or their respective controls.

Ala-AT activity increased dramatically in waterlogged IB plants under $a[CO_2]$, with a 523% increase compared to control plants (Figure 8D). IB plants consistently showed the highest Ala-AT activities, while co-inoculated CA, CR, and CAR plants had 37%, 54%, and 46% lower Ala-AT activity, respectively, compared to waterlogged IB plants. In the $e[CO_2]$ environment, waterlogged CR plants displayed the highest Ala-AT activity, 61% higher than that of IB plants, while CAR plants showed no significant difference from IB and CA plants exhibited 69% lower Ala-AT activity. During the reoxygenation period, Ala-AT activity was detectable; under $a[CO_2]$, only IB and CR plants had higher Ala-AT activity than their respective controls, while IB plants in control conditions showed lower Ala-AT activity compared to co-inoculated CA, CR, and CAR plants. In $e[CO_2]$, only the CR treatment demonstrated higher Ala-AT activity than its respective control during reoxygenation. Additionally, control plants from co-inoculated CA, CR, and CAR treatments in the $e[CO_2]$ environment had higher Ala-AT activity than solely inoculated IB control plants.

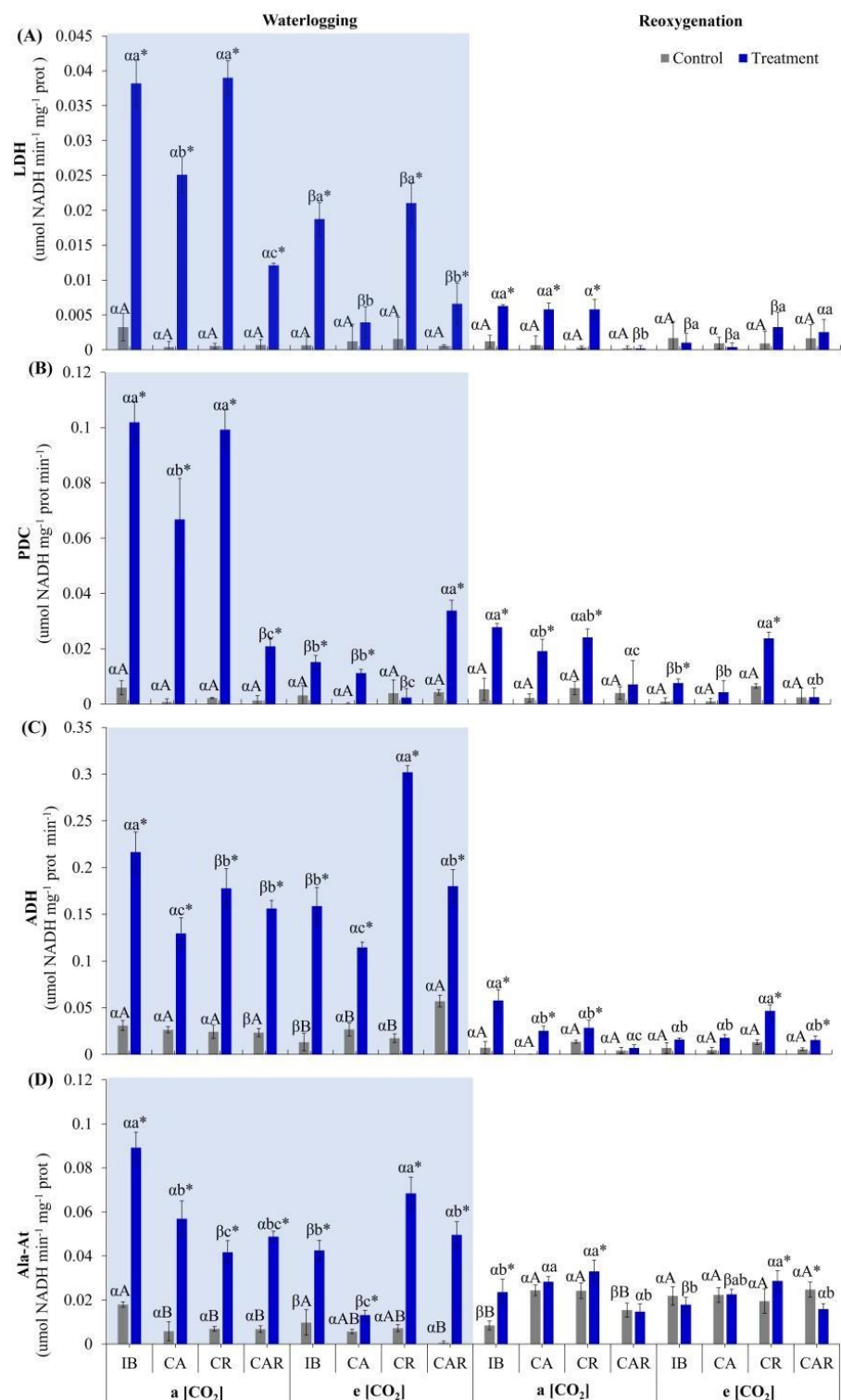


Figure 8. Fermentative enzyme activity. Activity of the enzymes lactate dehydrogenase (LDH) (A), pyruvate decarboxylase (PDC) (B), alcohol dehydrogenase (ADH) (C), and alanine aminotransferase (Ala-At) (D) in roots of soybean plants grown under different CO₂ concentrations (ambient concentration *a*[CO₂] or elevated concentration *e*[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean ± SD, *n* = 4. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (*t*-test; *p* < 0.05), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions,

lowercase letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, $p < 0.05$), and Greek letters indicate differences between treatment in $a[\text{CO}_2]$ or $e[\text{CO}_2]$ (t -test; $p < 0.05$). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

Overall, the results indicate that waterlogging induces significant changes in fermentative enzyme activities in roots, with varying effects influenced by CO_2 levels and microbiological treatments.

3.5. Effect of $e[\text{CO}_2]$ and Co-Inoculation on Biometric Parameters and Total Soluble Sugars

3.5.1. Biometric Parameters

Waterlogging drastically reduced leaf area (LA) regardless of CO_2 level or microbiological treatment (Figure 9A). Plants grown under $a[\text{CO}_2]$ reduced LA 44% when subjected to waterlogging, while plants grown under $e[\text{CO}_2]$ reduced LA 33% compared to their respective control plants. Differences between microbiological treatments were also observed, with solely inoculated IB plants in control conditions having 36% smaller LA than co-inoculated CA, CR, and CAR plants under $a[\text{CO}_2]$. The difference was reduced to 14% when these plants were waterlogged, but co-inoculated plants still showed larger LA. Plants grown under $e[\text{CO}_2]$ also differed between IB treatment and co-inoculation CA, CR, and CAR plants, as co-inoculated plants in control conditions had 8% larger LA than IB plants. This difference increased to 20% when waterlogged, maintaining higher values in co-inoculated plants. During reoxygenation, plants grown under $a[\text{CO}_2]$ maintained 37% smaller LA compared to control plants, while plants grown under $e[\text{CO}_2]$ maintained 22% smaller LA compared to their respective control plants. The difference between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants in control conditions was 20% smaller under $a[\text{CO}_2]$, reducing to 14% during reoxygenation. The ratio between control IB plants versus CA, CR, and CAR plants LA was 11% smaller for IB plants under $e[\text{CO}_2]$, increasing to 22% during reoxygenation.

The shoot dry mass (SDM) decreased during waterlogging in plants grown under $a[\text{CO}_2]$; however, plants from CR and CAR treatments did not differ from their respective control plants, contrary to what was observed in IB and CA plants, which significantly reduced their SDM during waterlogging (Figure 9B). Plants grown under elevated CO_2 reduced their SDM by 38% during waterlogging, regardless of microbiological treatment. Differences between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants in control conditions were 10%, increasing to 23% when plants were subjected to waterlogging in $a[\text{CO}_2]$ environment. When growing plants under $e[\text{CO}_2]$, the differences between IB and CA, CR, and CAR plants were 20% in control conditions and 9% when plants were waterlogged. During the reoxygenation period, differences between reoxygenated and control plants were even greater when comparing waterlogged versus control plants. Under $a[\text{CO}_2]$, reoxygenated plants had 31% lower SDM than control plants, and this difference was even greater under $e[\text{CO}_2]$, at 43%. During the reoxygenation period, regardless of microbiological treatment, all plants had lower SDM when compared to their respective control plants, with a difference between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants being 30% in control plants and 23% in reoxygenated plants when grown under $a[\text{CO}_2]$. Plants grown under elevated CO_2 during reoxygenation also reduced SDM regardless of microbiological treatment, with the SDM in solely inoculated IB control plants being 19% lower than in co-inoculation treatments CA, CR, and CAR. This difference was slightly smaller when evaluating these treatments under reoxygenation conditions, but reoxygenated IB plants still had 15% less SDM than CA, CR, and CAR plants.

Regardless of microbiological treatment or CO_2 level, waterlogged plants increased their stem diameter (SD) (Figure 9C). When plants were grown under $a[\text{CO}_2]$, the increase in SD due to waterlogging was 42%, whereas for plants grown under $e[\text{CO}_2]$, the increase in SD due to waterlogging was 17%. The increase in SD due to co-inoculation (i.e., IB plants vs.

CA, CR, and CAR plants) was 2% to 8% between control plants when grown under $a[\text{CO}_2]$ and $e[\text{CO}_2]$, respectively. When comparing waterlogging plants under $a[\text{CO}_2]$ environment, the average difference between IB plants and CA, CR, and CAR plants was 10%, increasing to 14% when comparing this group of treatments under $e[\text{CO}_2]$. During the reoxygenation period, reoxygenated plants grown under $a[\text{CO}_2]$ still had a 16% larger SD when compared to control plants, and reoxygenated plants grown under $e[\text{CO}_2]$ also had a 5% larger SD when compared to their respective control plants. Co-inoculated CA, CR, and CAR plants under $a[\text{CO}_2]$ and control conditions had a 5% larger SD than solely inoculated IB plants, and this value was consistent for plants during the reoxygenation. Control plants from co-inoculation treatments grown under $e[\text{CO}_2]$ had a 9% larger SD than solely inoculated IB plants, increasing to 13% when these groups of plants were reoxygenated.

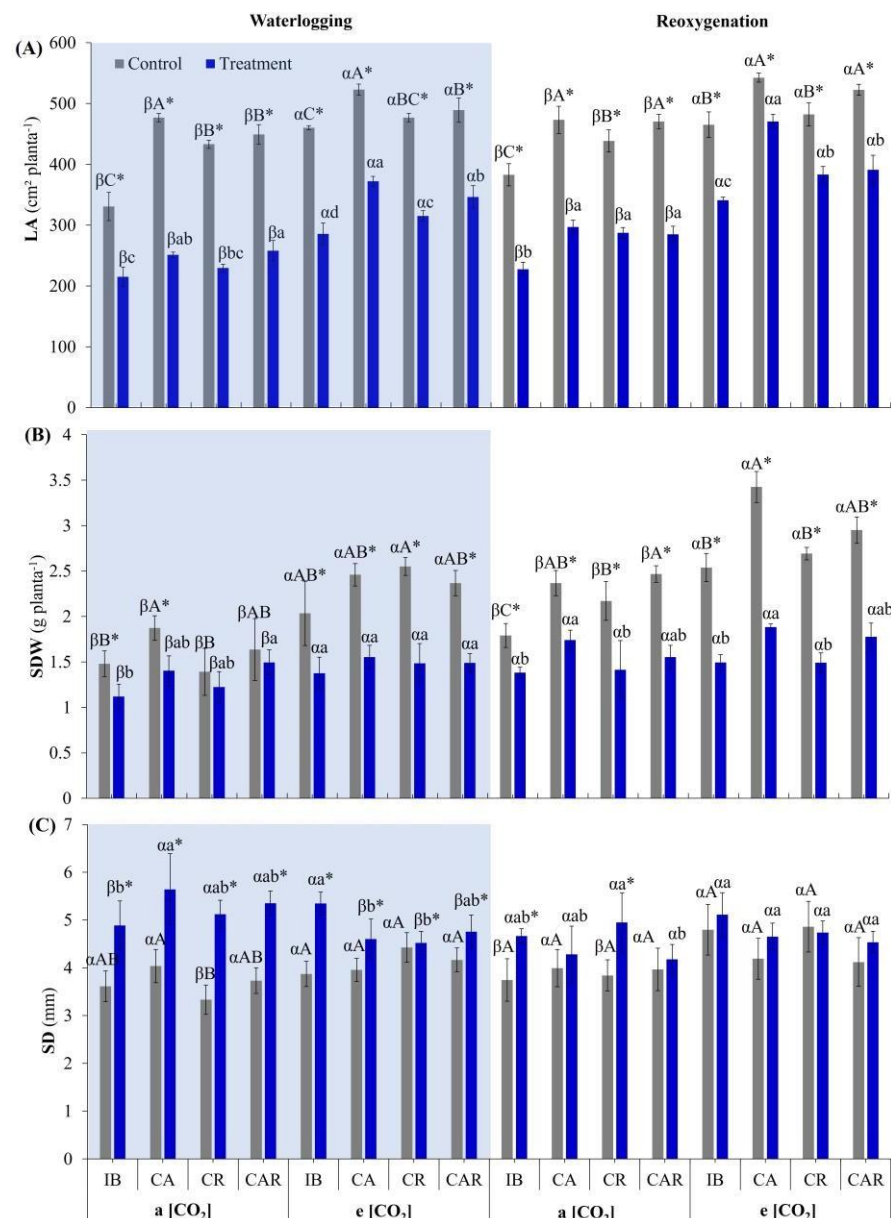


Figure 9. Shoot biometric parameters. Leaf area (LA) (A), shoot dry mass (SDM) (B), and stem diameter (SD) (C) in soybean plants grown under different CO₂ concentrations (ambient concentration $a[\text{CO}_2]$ or elevated concentration $e[\text{CO}_2]$) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean $\pm$ SD, $n = 4$. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (t -test);

$p < 0.05$), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lower-case letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, $p < 0.05$), and Greek letters indicate differences between treatment in $a[\text{CO}_2]$ or $e[\text{CO}_2]$ (t -test; $p < 0.05$). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

3.5.2. Total Soluble Sugars and Root Fresh Weight

The total soluble sugar (TSS) content in roots decreased with waterlogging time, regardless of microbiological treatment or the CO_2 level at which the plants were grown (Figure 10A). The amount of TSS in control plants grown under $e[\text{CO}_2]$ was 37% higher than in control plants grown under $a[\text{CO}_2]$; when the plants were waterlogged, this difference was 57%. Plants grown under $a[\text{CO}_2]$ reduced their TSS content by 46% when waterlogged, while plants grown under $e[\text{CO}_2]$ reduced their TSS content by 37% compared to their respective control plants. TSS content in solely inoculated IB plants was lower than in co-inoculated CA, CR, and CAR plants, with a difference of 63% in plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and 43% in plants grown under $e[\text{CO}_2]$. When plants were waterlogged, differences between solely inoculated IB and co-inoculated CA, CR, and CAR were 12% for $a[\text{CO}_2]$ and 33% for $e[\text{CO}_2]$. During the reoxygenation period, the difference between reoxygenated plants and their respective control plants was smaller than the difference between waterlogged plants and their control plants, being 25% regardless of CO_2 level. During reoxygenation, differences persisted between solely inoculated IB and co-inoculated CA, CR, and CAR plants, with co-inoculated plants showing higher TSS content than solely inoculated IB plants, whether in control conditions of $a[\text{CO}_2]$ by 46% or under $e[\text{CO}_2]$ by 44%, or in reoxygenated conditions by 40% for plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and 50% for plants under $e[\text{CO}_2]$. An important result is that co-inoculated plants accumulate more TSS than solely inoculated plants, and plants grown under $e[\text{CO}_2]$ accumulate even more TSS than plants grown under $a[\text{CO}_2]$. However, IB plants grown under $e[\text{CO}_2]$ are equivalent to co-inoculated plants grown under $a[\text{CO}_2]$, showing that co-inoculation and increased CO_2 levels have similar effects concerning the TSS levels.

Fresh root mass (FRM) decreased during waterlogging time, regardless of CO_2 level; however, for CAR plants grown under $a[\text{CO}_2]$, this reduction was not significant (Figure 10B). Plants grown under $a[\text{CO}_2]$ reduced their FRM by 37% during waterlogging, which was less when compared to waterlogged plants under $e[\text{CO}_2]$ and their respective control plants, being only 27% lower. Solely inoculated IB plants also differed from co-inoculated CA, CR, and CAR plants, showing lower FRM, with a difference of 19% for control plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and 32% for control plants grown under $e[\text{CO}_2]$. However, the difference between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants when exposed to waterlogging was 30% for plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and 36% for plants grown under $e[\text{CO}_2]$, with FRM always higher in co-inoculated plants. During the reoxygenation period, differences persisted between reoxygenated and control plants, with reoxygenated plants showing lower FRM when compared to control plants, 32% lower for $a[\text{CO}_2]$ and 44% lower for $e[\text{CO}_2]$. The difference between solely inoculated IB plants and co-inoculated CA, CR, and CAR plants in control conditions during this period was 32% higher for co-inoculated plants grown under $a[\text{CO}_2]$ and 18% higher for co-inoculated plants grown under $e[\text{CO}_2]$. Among reoxygenated plants, co-inoculated CA, CR, and CAR plants also had higher FRM when compared to solely inoculated IB plants, being 24% higher when plants were grown under $a[\text{CO}_2]$ and only 2% higher when grown under $e[\text{CO}_2]$.

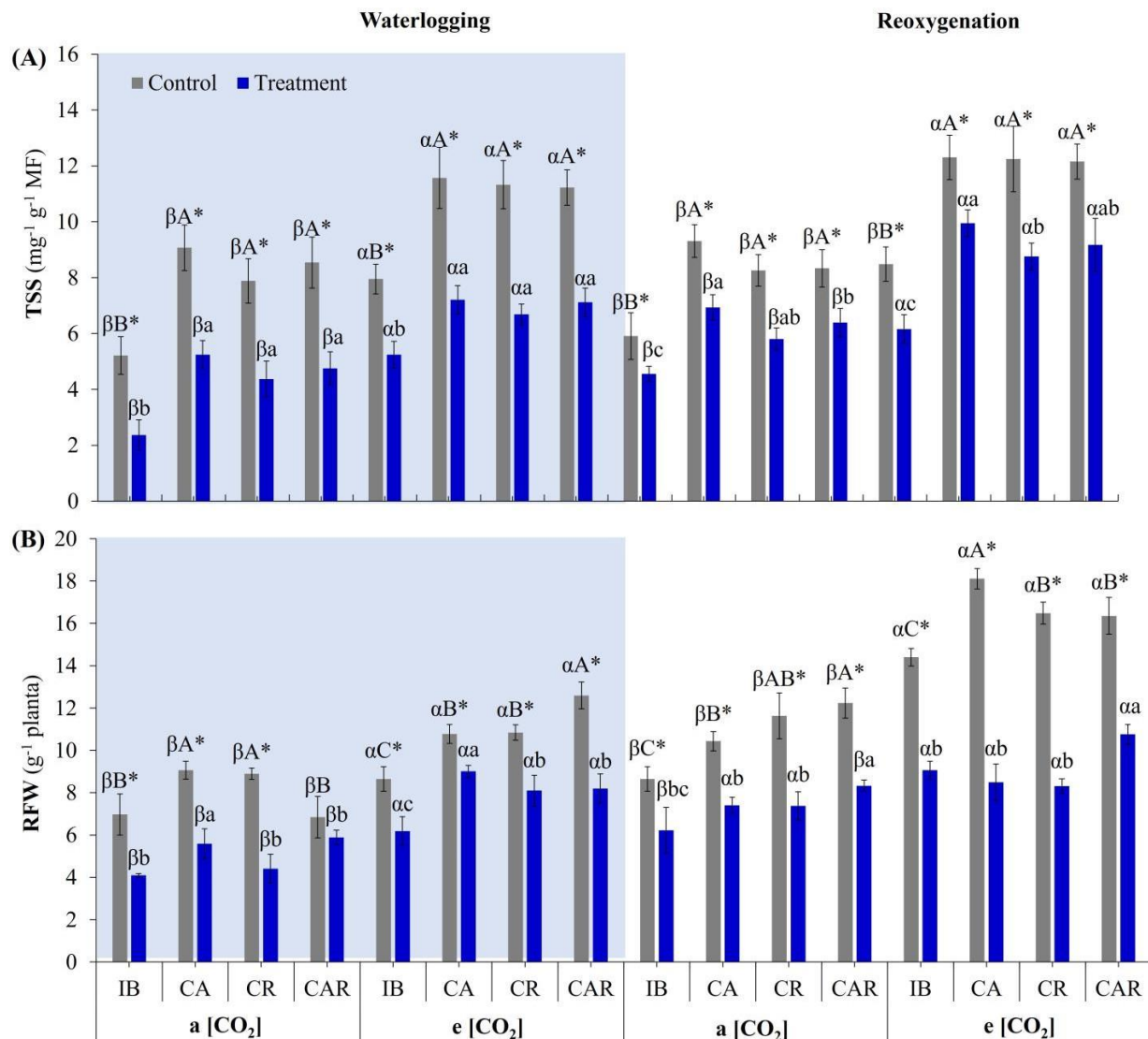


Figure 10. Root biometric parameters. Accumulation of total soluble sugars (TSS) (A) and root fresh mass (RFM) (B) in roots of soybean plants grown under different CO₂ concentrations (ambient concentration *a*[CO₂] or elevated concentration *e*[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by reoxygenation (four days). Values represent the mean ± SD, *n* = 4. Asterisks indicate a difference between control or waterlogged/reoxygenated plants (*t*-test; *p* < 0.05), uppercase letters indicate differences between treatments under control conditions, lower-case letters indicate differences between treatments under waterlogging/reoxygenated conditions (Tukey, *p* < 0.05), and Greek letters indicate differences between treatment in *a*[CO₂] or *e*[CO₂] (*t*-test; *p* < 0.05). IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation with *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR—triple inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.

3.5.3. Principal Component Analysis and Hierarchical Clustering Analysis

The results for most variables showed clear differentiation between control plants and those subjected to waterlogging and/or reoxygenation conditions. Plants were grown under two CO₂ concentrations: ambient (400 μmol mol⁻¹, *a*[CO₂]) and elevated (750 μmol mol⁻¹, *e*[CO₂]). Additionally, plants were either inoculated with *Bradyrhizobium* (IB) or co-inoculated with *Azospirillum* (CA), *Rhizophagus* (CR), or both (CAR). Given the range of variables analyzed and the treatments applied, the results were consistently presented by comparing these six main groups, with specific emphasis on microbiological treatments when necessary.

Principal component analysis (PCA) of leaf data (Figure 11) involved 16 variables and used two principal components that explained 63.5% of the variation in plant shoot responses. PC1 accounted for 43.1%, while PC2 explained 20.4%. The variables SOD, H₂O₂, APX, CAT, SD, and MDA positively influenced PC1 in decreasing order of importance, followed by Chlo_*a*, C_i, Chlo_Total, A, Carot, SDW, *g_s*, E, and LA, which negatively influenced PC1 in decreasing order. For PC2, the variables C_i, A, CAT, APX, LA, SOD, SDW, and SD positively influenced the component, while E, *g_s*, Carot, H₂O₂, Chlo_*a*, Chlo_Total, Chlo_*b*, and MDA exerted a negative influence. The 95% confidence intervals, as shown in Figure 11, revealed an intricate relationship among the plant groups studied, with greater dispersion observed on the right side of the PCA plot, while the left side primarily included groups that were more closely clustered and less dispersed.

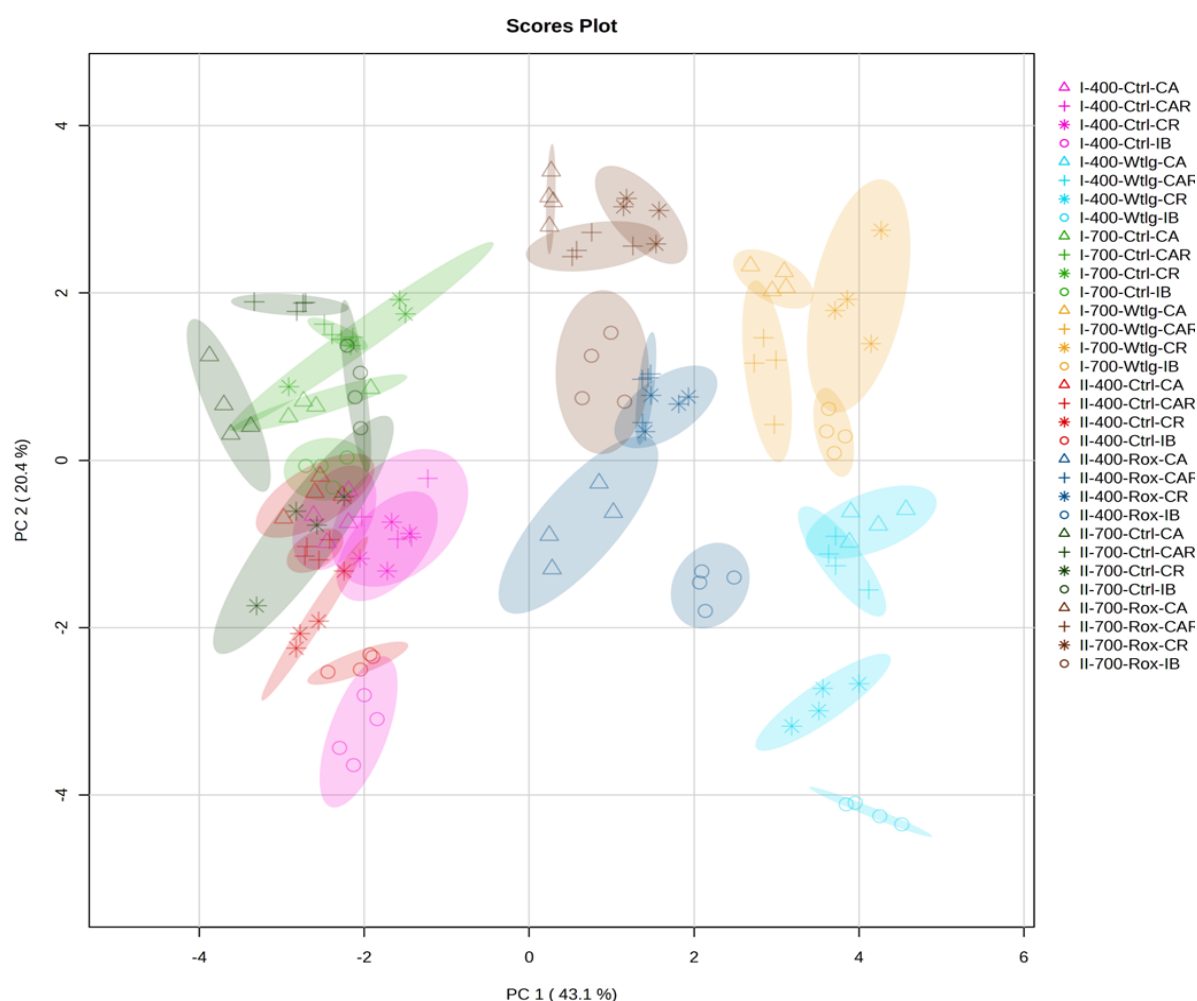


Figure 11. Principal component analysis (PCA) was performed using PC1 and PC2 derived from morphophysiological and biochemical characteristics in the shoots of soybean plants grown under different symbiotic associations and subjected to waterlogging for seven days, followed by four days of reoxygenation, under either elevated CO₂ (*e*[CO₂]) or ambient CO₂ (*a*[CO₂]) conditions. I—first sampling during waterlogging; II—second sampling during reoxygenation; 400—plants grown under *a*[CO₂]; 700—plants grown under *e*[CO₂]; Ctrl—plants maintained as hydric controls; Wtlg—plants subjected to waterlogging; Rox—plants undergoing reoxygenation; IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation of *Rhizopagus intraradices* and *Bradyrhizobium*; CAR—triple co-inoculation of *Bradyrhizobium*, *Azospirillum brasilense*, and *Rhizopagus intraradices*. Ellipses of different colors delineate the 95% confidence intervals, with colors chosen according to the water treatment in each CO₂ environment. Different symbols represent the microbiological treatments.

In contrast, PCA of root system data (Figure 12) explained 80.4% of the variance, with PC1 accounting for 61.4% and PC2 representing 19%. For PC1, the variables with the most positive impact were RFW and TSS, whereas CAT, SOD, APX, PDC, H_2O_2 , Ala-AT, MDA, and LDH had a negative influence, in decreasing order. For PC2, H_2O_2 , MDA, PDC, and LDH positively influenced the component, while Ala-AT, ADH, RFW, TSS, APX, SOD, and CAT negatively influenced PC2. Similar to the shoot, an intricate relationship between plant groups was observed in the roots, with more distinction on the left side of the PCA plot while groups on the right were more clustered.

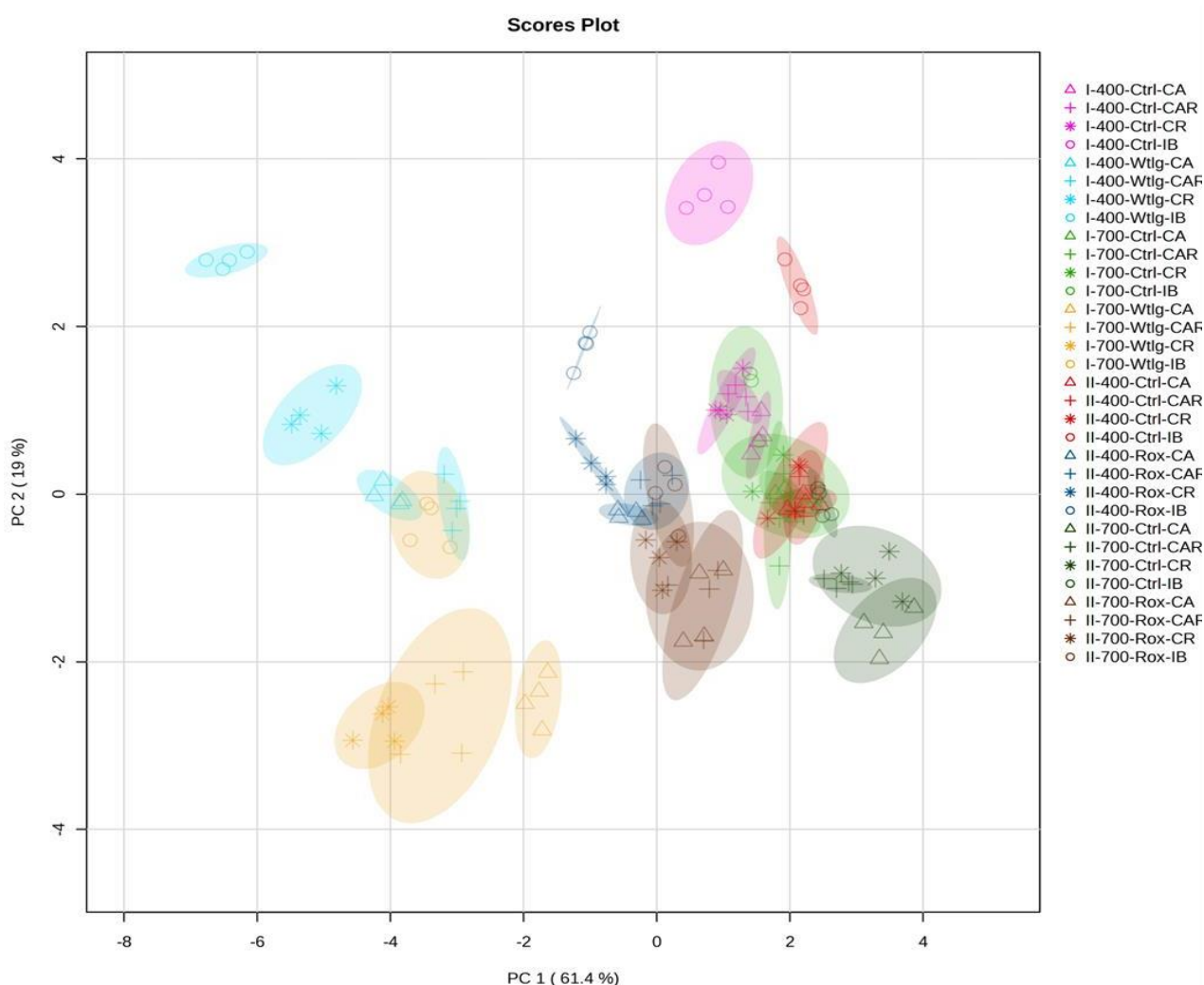


Figure 12. Principal component analysis (PCA) was performed using PC1 and PC2 derived from morphophysiological and biochemical characteristics in the roots of soybean plants grown under different symbiotic associations and subjected to waterlogging for seven days, followed by four days of reoxygenation, under either elevated CO_2 ($e[CO_2]$) or ambient CO_2 ($a[CO_2]$) conditions. I—first sampling during waterlogging; II—second sampling during reoxygenation; 400—plants grown under $a[CO_2]$; 700—plants grown under $e[CO_2]$; Ctrl—plants maintained as hydric controls; Wtlg—plants subjected to waterlogging; Rox—plants undergoing reoxygenation; IB—*Bradyrhizobium* inoculation; CA—co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium*; CR—co-inoculation of *Rhizopagus intraradices* and *Bradyrhizobium*; CAR—triple co-inoculation of *Bradyrhizobium*, *Azospirillum brasilense*, and *Rhizopagus intraradices*. Ellipses of different colors delineate the 95% confidence intervals, with colors chosen according to the water treatment in each CO_2 environment. Different symbols represent the microbiological treatments.

Hierarchical clustering analysis (HCA) was employed to better visualize these differences, enhancing the multivariate data interpretation. Similar to the PCA results, the HCA analysis for the shoot (Figure 13) revealed four distinct groups. The first group was characterized by high lipid peroxidation (increased MDA levels), with waterlogged plants exhibiting the highest levels. Among the waterlogged plants, those grown under $e[\text{CO}_2]$ showed lower lipid peroxidation. Regardless of CO_2 concentration, plants inoculated only with *Bradyrhizobium* (IB) exhibited the highest MDA levels compared to other microbial treatments (CA, CR, and CAR). A similar pattern was observed for H_2O_2 production. The second group was primarily influenced by enzymatic antioxidant activity, with increased activity in waterlogged plants across both CO_2 levels. Notably, plants grown under $e[\text{CO}_2]$ exhibited higher enzymatic activity than those grown under $a[\text{CO}_2]$. Significant differences were observed between the IB and co-inoculation treatments (CA, CR, and CAR), irrespective of CO_2 levels. Higher CAT activity was observed compared to APX under $e[\text{CO}_2]$, while APX activity dominated under $a[\text{CO}_2]$.

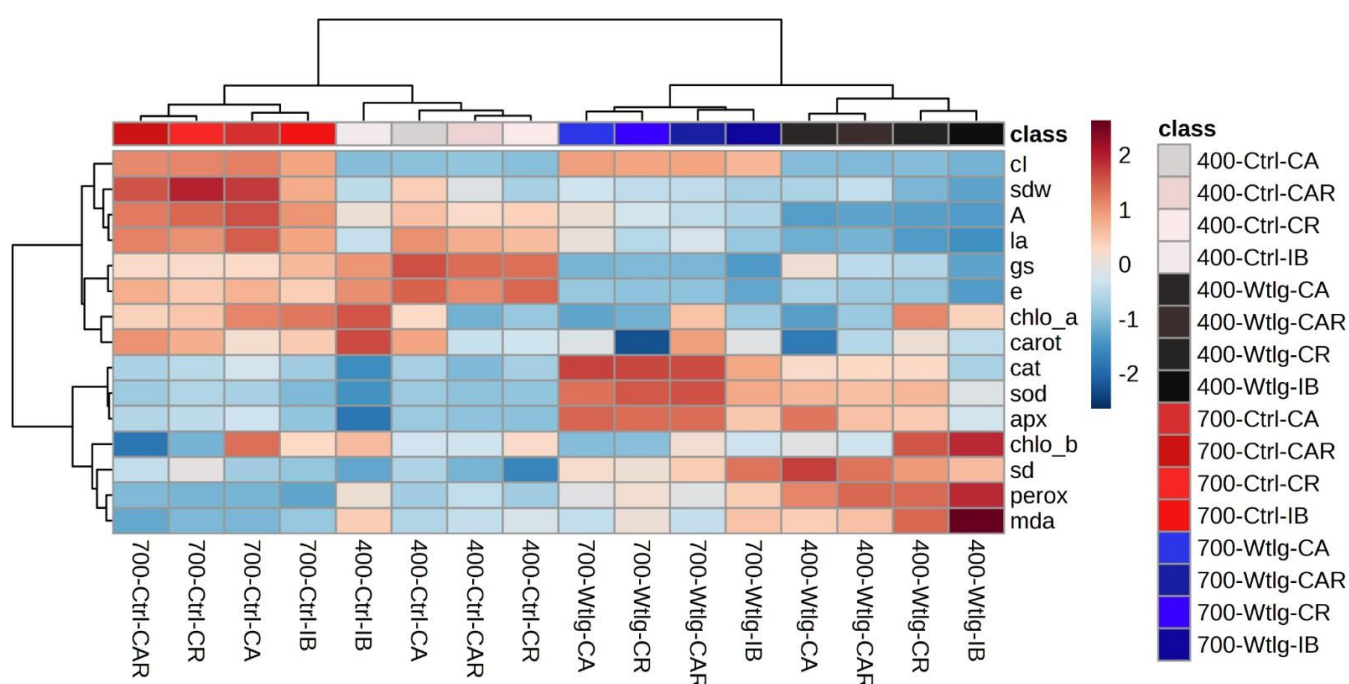


Figure 13. Hierarchical clustering analysis (HCA) of H_2O_2 , MDA, Chlo_ $_a$, Chlo_ $_b$, SOD, CAT, and APX enzyme activities, gas exchange parameters (g_s , E , A , and C_i), and biometric measurements (LA, SD, SDW) in the shoots of waterlogged soybean plants grown under elevated CO_2 ($e[\text{CO}_2]$) or ambient CO_2 ($a[\text{CO}_2]$) conditions. Variations in red and blue colors indicate increases and decreases, respectively, for each variable. Light gray shades represent control plants grown under $a[\text{CO}_2]$, while dark gray shades represent waterlogged plants grown under $a[\text{CO}_2]$. Red shades indicate control plants grown under $e[\text{CO}_2]$, and blue shades represent waterlogged plants grown under $e[\text{CO}_2]$.

The third group was influenced by g_s , E , Chlo_ $_a$, Carot, and LA, which all decreased during waterlogging, regardless of CO_2 concentration. However, plants grown under $a[\text{CO}_2]$ exhibited higher averages, except for LA, which was greater in control plants co-inoculated with CA, CR, and CAR under $e[\text{CO}_2]$. Regarding microbial treatments, control plants inoculated with IB and grown under $a[\text{CO}_2]$ had the highest carotenoid and Chlo_ $_a$ levels, while higher g_s and E values characterized co-inoculated plants (CA, CR, and CAR). The final group was influenced by C_i , SDW, and A , more representative of control plants grown under $e[\text{CO}_2]$. Waterlogging negatively affected these variables, reducing them across both CO_2 levels. Although not significantly different among microbial treatments, C_i remained elevated during waterlogging. SDW and A were significantly

higher in co-inoculated plants, with greater responsiveness under $e[\text{CO}_2]$. Interestingly, under control conditions at $e[\text{CO}_2]$, CR-treated plants had higher SDW, while CA or CAR treatments had higher averages for A and LA . Notably, CA-treated plants did not group with IB-treated plants.

During reoxygenation, the shoot results for HCA (Figure 14) began to resemble those of control conditions, reducing the number of treatment groups to three: control plants under $e[\text{CO}_2]$, control plants under $a[\text{CO}_2]$, and plants undergoing reoxygenation. This contrasts with the four groups observed during waterlogging.

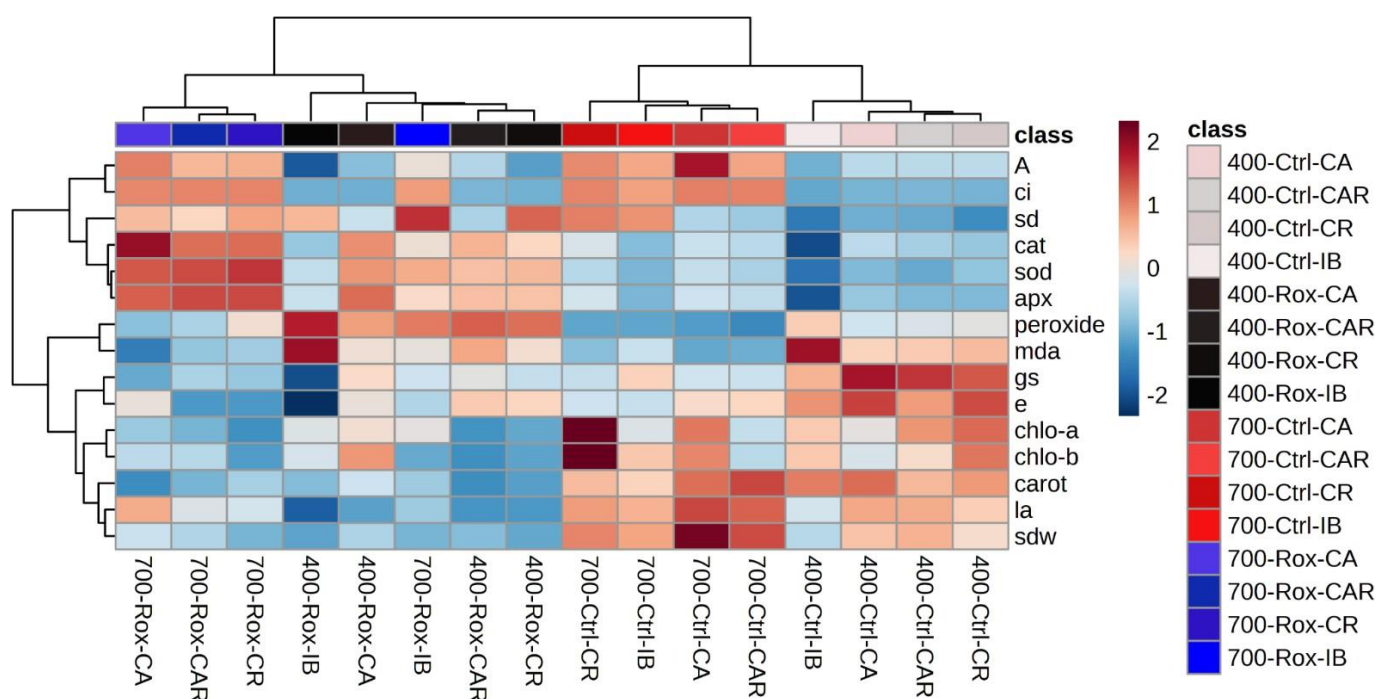


Figure 14. Hierarchical clustering analysis (HCA) of H_2O_2 , MDA, Chlo_ a , Chlo_ b , SOD, CAT, and APX enzyme activities, gas exchange parameters (g_s , E , A , and C_i), and biometric measurements (LA , SD , SDW) in the shoots of reoxygenated soybean plants grown under elevated CO_2 ($e[\text{CO}_2]$) or ambient CO_2 ($a[\text{CO}_2]$) conditions. Variations in red and blue colors indicate increases and decreases, respectively, for each variable. Light gray shades represent control plants grown under $a[\text{CO}_2]$, while dark gray shades represent waterlogged plants grown under $a[\text{CO}_2]$. Red shades indicate control plants grown under $e[\text{CO}_2]$, and blue shades represent waterlogged plants grown under $e[\text{CO}_2]$.

HCA analysis of the root system (Figure 15) did not yield the same four groups seen in the shoot. Plants grown under $e[\text{CO}_2]$ had higher TSS concentrations and RFW than those grown under $a[\text{CO}_2]$. Under waterlogging, both TSS and RFW decreased, with co-inoculated plants showing higher TSS and RFW levels regardless of CO_2 concentration. The antioxidant system (CAT, SOD, and APX) was more strongly induced in plants grown under $e[\text{CO}_2]$ compared to $a[\text{CO}_2]$, with its activity increasing during waterlogging at both CO_2 levels. Although H_2O_2 and MDA were not influenced by CO_2 concentration, their levels significantly increased during waterlogging, with higher values observed in plants grown under $a[\text{CO}_2]$. Fermentative metabolism was also induced by waterlogging, with enzymes ADH, PDC, and Ala-AT showing lower activity in plants grown under $e[\text{CO}_2]$ compared to $a[\text{CO}_2]$.

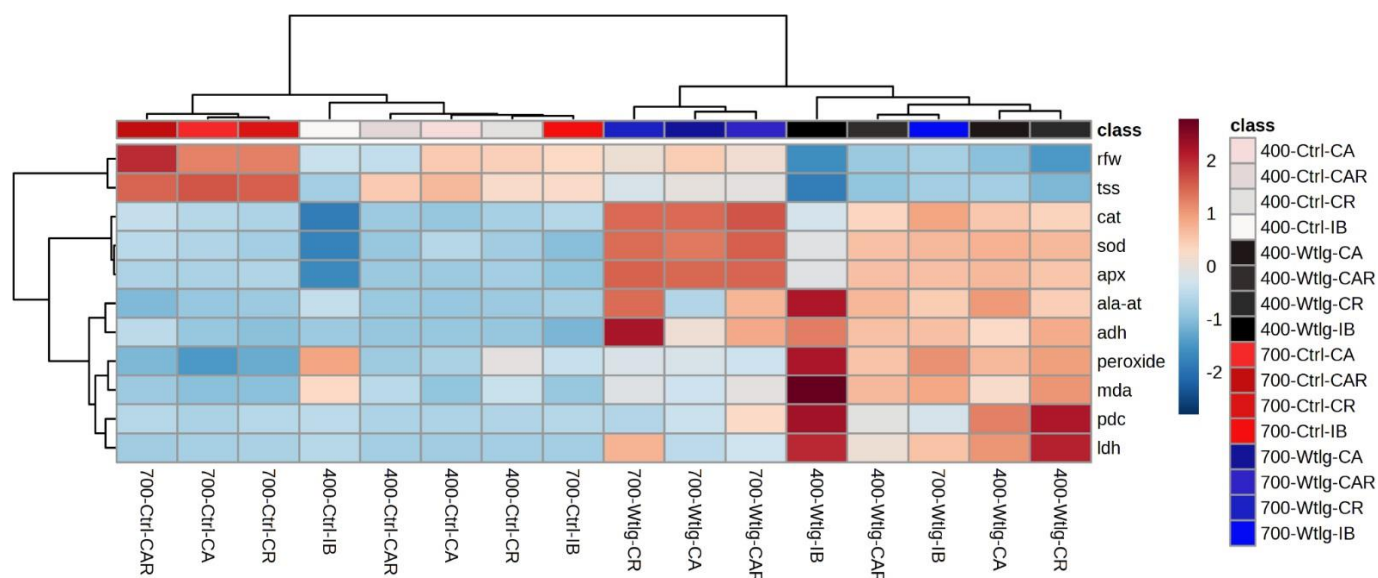


Figure 15. Hierarchical clustering analysis (HCA) of H_2O_2 , MDA, TSS, SOD, CAT, APX, ADH, LDH, PDC, and Ala-AT enzyme activities, as well as RFW in the roots of waterlogged soybean plants grown under elevated CO_2 ($e[CO_2]$) or ambient CO_2 ($a[CO_2]$) conditions. Variations plotted in red and blue colors on a log10 scale indicate increases and decreases, respectively, for each variable. Light gray shades represent control plants grown under $a[CO_2]$, while dark gray shades denote waterlogged plants grown under $a[CO_2]$. Red shades indicate control plants grown under $e[CO_2]$, and blue shades represent waterlogged plants grown under $e[CO_2]$.

Interestingly, fermentative enzyme activity was higher in IB-treated plants, while co-inoculated plants (CA, CR, and CAR) showed reduced fermentative activity. Lactic fermentation was more prevalent than alcoholic fermentation under $a[CO_2]$, especially in IB and CR treatments. Under $e[CO_2]$, both LDH and ADH activities were highest in IB and CR treatments, while alcoholic fermentation dominated in CA and CAR treatments.

During reoxygenation, the root system did not separate into four groups (Figure 16), with only control and reoxygenation groups being distinguishable. Co-inoculated plants showed higher TSS and RFW levels, with both variables significantly higher under $e[CO_2]$. Although RFW did not increase significantly during reoxygenation, TSS accumulation was restored, particularly in co-inoculated plants under $e[CO_2]$, with IB plants having the lowest TSS content. The antioxidant system (CAT, SOD, and APX) remained active during reoxygenation, with co-inoculated plants showing significantly higher activity compared to IB-only plants under $a[CO_2]$. Under $e[CO_2]$, the difference between co-inoculated and IB-only plants was smaller, likely due to the effect of $e[CO_2]$ on increasing enzymatic activity. Similar patterns were observed for H_2O_2 and MDA, with lower levels of peroxide and lipid peroxidation levels in plants grown under $e[CO_2]$. Fermentative metabolism remained active under $a[CO_2]$, while co-inoculated plants and those grown under $e[CO_2]$ showed reduced fermentative enzyme activity after reoxygenation.

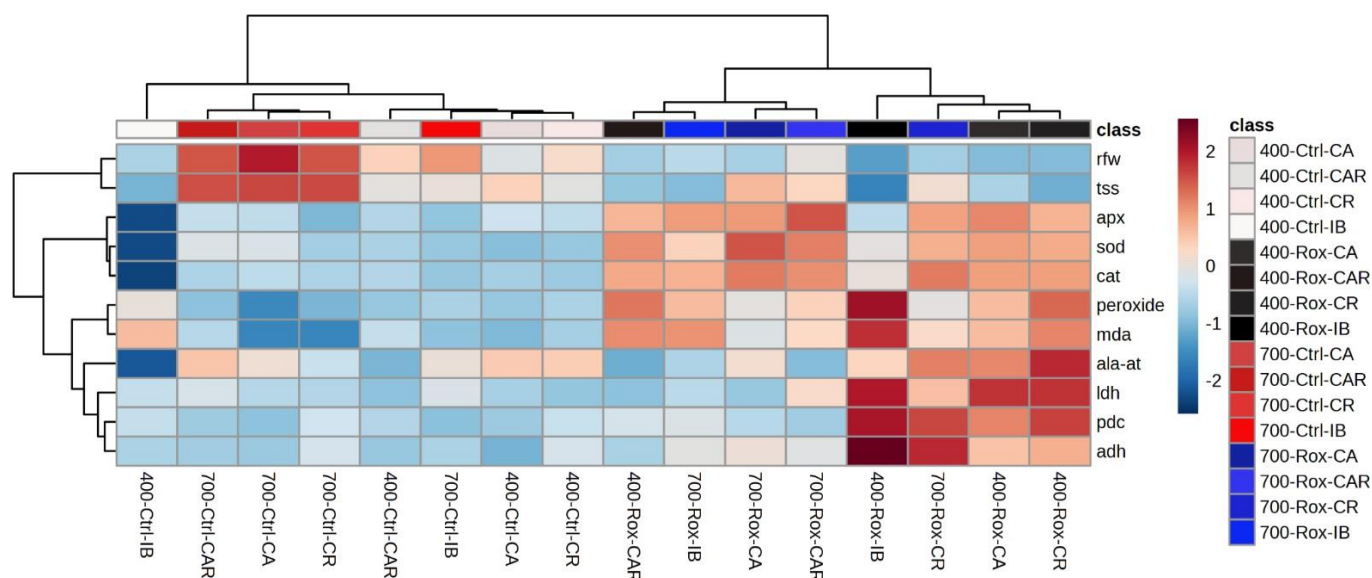


Figure 16. Hierarchical clustering analysis (HCA) of H_2O_2 , MDA, TSS, SOD, CAT, APX, ADH, LDH, PDC, and Ala-AT enzyme activities, as well as RFW in the roots of reoxygenated soybean plants grown under elevated CO_2 ($e[CO_2]$) or ambient CO_2 ($a[CO_2]$) conditions. Variations plotted in red and blue colors on a log10 scale indicate increases and decreases, respectively, for each variable. Light gray shades represent control plants grown under $a[CO_2]$, while dark gray shades denote waterlogged plants grown under $a[CO_2]$. Red shades indicate control plants grown under $e[CO_2]$, and blue shades represent waterlogged plants grown under $e[CO_2]$.

4. Discussion

During waterlogging, the reduction observed in A , g_s , E , and C_i was already expected, as described by [29,41]. Waterlogging reduces water absorption through aquaporins, which automatically limit the gas exchanges in plant leaves [42]. Lower rates of A in waterlogged plants are also related to a possible decrease in carbon at the active site of Rubisco caused by the reduction in g_s , which limits the diffusion of CO_2 [43]. We observed that the C_i of IB plants grown in $a[CO_2]$ was the lowest value found. In contrast, $e[CO_2]$ improved the performance of g_s , E , and C_i and enhanced A across all treatments. In plants with C3 photosynthetic metabolism, this improved performance in gas exchanges under $e[CO_2]$ can be attributed to reduced photorespiration and greater water use and efficiency [43]. The reduced waste of energy, water, and carbon due to decreased photorespiration in plants grown in $e[CO_2]$ likely counteracts the harmful effects of waterlogging on soybean gas exchanges.

Furthermore, plants grown in $e[CO_2]$ show better nodulation and N_2 fixation, a metabolism severely affected by waterlogging [14,44,45]. Thus, $e[CO_2]$ also supports nitrogen metabolism, as plants with improved nitrogen metabolism perform better under waterlogging conditions [46,47]. This improved performance is primarily due to signaling and detoxification by nitric oxide (NO) and nitrogen recycling between the aerial part, under normoxia, and the root system (under hypoxia) [45,48].

It was also found that co-inoculated plants CA, CR, and CAR, regardless of the cultivation environment, $a[CO_2]$ or $e[CO_2]$, showed better responses in the gas exchange parameters A , g_s , E , and C_i under waterlogging conditions. When plants are co-inoculated, they exhibit improvements in P and N metabolism, which greatly enhances their response to waterlogging [49,50]. Co-inoculated plants CA, CR, and CAR also have higher expression of genes related to aquaporin activity, so it is possible that changes in aquaporin activity help during stress, improving overall plant responses to waterlogging [51,52].

During the reoxygenation period, it was noticed that just four days were insufficient for plants to reach the A values of control plants in the $a[CO_2]$ environment. However, under

the $e[CO_2]$ environment, reoxygenated plants managed to reach the levels of their respective control plants, indicating that the issue is indeed directly related to the lack of carbon, even during reoxygenation. The recovery of A during reoxygenation is not a common occurrence in soybean plants [29]. However, in CA and CAR plants, A levels reached those of control plants even under the $a[CO_2]$ environment. Among the co-inoculation treatments, the most efficient response with *Azospirillum* might be related to the resumption of nitrogen fixation and phytohormone synthesis [49,50,53]. This recovery is likely related to increased activity of the enzyme nitrogenase, considering that the main N source in plants associated with PGPB is the atmospheric N_2 [54]. In plants co-inoculated with *Rhizophagus*, the best responses might be related to increased phosphorus absorption and assimilation [55,56].

It is known that plants associated with mycorrhizas exhibit better nutrient absorption rates, and when co-inoculated with diazotrophs, N_2 fixation is improved [53,56,57]. Both P and N metabolisms can influence A rates. Phosphorus metabolism is directly linked to energy production cellular structures as components of phosphoric esters, phospholipids, nucleotides, such as ATP, and nucleic acids (DNA, RNA) [58]. Nitrogen metabolism is associated with the production of amino acids, proteins, enzymes, coenzymes, nucleic acids, vitamins, lipoproteins, and chlorophylls. Thus, co-inoculated plants can better respond in the post-stress period [59]. It is also possible that increased demand for carbohydrates due to the presence of more microorganisms serves as a stimulus for the plant to rapidly increase its photosynthesis during reoxygenation to sustain microbiological interactions.

Photosynthetic pigments are typically reduced during waterlogging, either due to ROS action on chloroplast membranes or to nitrogen deficiency from reduced fixation, which may lead the plant to nitrogen remobilization [29,47,60]. The IB treatment reduced the Chl_a content but increased Chl_b , showing no difference in total Chl content during waterlogging. Changes in chlorophyll ratios are related to the plant's attempts to overcome stress. Kim et al. [61] showed that after nine days of waterlogging, it was possible to separate tolerant from sensitive plants by evaluating chlorophyll content in the first fully expanded leaf, though the author found no differences before six days of treatment. In this study, the most significant reductions were observed during the reoxygenation period. These reductions likely occurred for the same reasons: ROS and nitrogen deficiency, as during reoxygenation, plants still exhibited higher levels of H_2O_2 , and fixation likely had not yet been fully restored.

The pigment vs. waterlogging dynamics are altered by co-inoculation [62,63]. Photosynthetic pigments (Chl_a , Chl_b , Car) protect the plant against oxidative damage caused by radiation excess, which should occur due to reduced photosynthetic efficiency during waterlogging. Studies with priming indicate better pigment accumulation responses under waterlogging conditions, providing aspects of waterlogging tolerance [64,65]. Pigments and the photorespiratory cycle's carbon oxidation in C3 plants provide a baseline level of protection against excess light energy, quickly quenching the excited state of chlorophyll, dissipating excess adenosine triphosphate (ATP), and reducing the light reactions of photosynthesis, respectively [66]. In cases of leaf senescence and pigment degradation, these can be used as a nutrient source for young leaves, particularly N, considering that fixation is limited by waterlogging [67]. This nutrient remobilization during or after stress may be an alternative for the plant to overcome the stressful situation, especially if co-inoculation CA, CR, and CAR enhance this nitrogen remobilization.

Co-inoculated plants can increase pigment levels even under water deficit, maintaining better photosynthetic responses [68]. For other authors [69,70], the higher concentration of pigments in plants co-inoculated with plant PGPB is attributed to hormonal modulation by microorganisms in the plant, primarily auxin. Meanwhile, ethylene promotes Chlorophyllase genes and induces accelerated chlorophyll destruction [71]. Auxin and cytokinins inhibit chlorophyll loss during wheat chloroplast aging in vivo and in vitro [71]. The modulation of phytohormones by microorganisms results in reduced losses of photosynthetic pigments under stress conditions.

The accumulation of ROS during waterlogging is a common answer, as it happens with other stresses [72]. In the early hours of waterlogging, the increase in H_2O_2 levels is seen as a signaling response [60]. The problem arises as H_2O_2 levels increase over time to the point of causing cellular damage, such as lipid peroxidation (MDA). In leaves, during waterlogging, two major sources of H_2O_2 are enhanced: the first is the electron transport chain of photosynthesis. With reduced photosynthetic efficiency, electrons are released into the intermembrane space, which reacts with oxygen to form a superoxide anion, harming the cells. The second source is photorespiration, which is also increased with reduced photosynthetic efficiency, driven by reduced g_s , E , and C_i , resulting in higher oxygenase activity of Rubisco.

In the roots, there is also an increase in H_2O_2 levels, mainly in the initial period of waterlogging [60]. Over time, the trend is for H_2O_2 levels in roots to decrease, possibly due to a lack of oxygen. Nevertheless, MDA levels remain high in hypoxic roots, likely due to the lack of an efficient antioxidant system. In roots, the main source of H_2O_2 production is the mitochondrial electron transport chain at the end of respiration. What was observed in this study is that regardless of the tissue, leaf, or root, in $e[CO_2]$ environments, there is a reduction in H_2O_2 production and lower MDA, indicating that $e[CO_2]$ may mitigate the deleterious effects of waterlogging.

In leaves, the beneficial effect of $e[CO_2]$ is likely related to lower rates of photorespiration [43]. Nevertheless, it was found that in roots, approximately half of the MDA content was found in leaves. In roots, it is believed that this effect is indirect; $e[CO_2]$ improved the performance of the antioxidant system (CAT, SOD, and APX antioxidant enzymes), which in turn detoxifies the stress-related ROS, as seen in other cases [73–75]. Mitigating effects on oxidative stress were also observed in co-inoculated plants from CA, CR, and CAR treatments, proving that co-inoculation can contribute to improving plants' responses to stress-related elevated levels of H_2O_2 and MDA, both in roots and leaves.

During the reoxygenation period, oxidative stress tends to increase, especially in sensitive species, regardless of whether the treatments have mitigating effects, though comparable results are described in the literature [46,60,64,76]. This increase in H_2O_2 during the reoxygenation period is linked to the reoxygenation of the root system. The rapid increase in O_2 in previously hypoxic roots results in oxidative damage to membranes during reoxygenation. Even though antioxidant activity is elevated, it is not sufficient to mitigate the effect of high H_2O_2 levels. What was observed in the study is that in co-inoculated plants from CA, CR, and CAR treatments, lower levels of MDA are related to the higher antioxidant activity of the SOD, CAT, and APX enzymes.

It is believed that the mitigation of oxidative stress by microorganisms is due to the activation of the antioxidant system (CAT, SOD, and APX enzymes) because of systemic acquired resistance and systemic induced resistance, SAR, and SIR, respectively [24,77,78]. When the plant first encounters one microorganism, it is perceived as a pathogen, activating its defense mechanisms and assisting in future stresses. Since microorganisms are also subjected to waterlogging stress, it is believed that the plant's and microorganisms' antioxidant activities converge in combating ROS. In CA, CAR, and CAR co-inoculated plants, the activity of antioxidant enzymes may be mediated by more rapid and effective signaling. Other studies show that more robust plants, with greater biomass, higher nutrient absorption, particularly P and N, higher sugar concentrations, supported by increased A , and better water use and efficiency, among other characteristics, exhibit better performance when dealing with stressful situations [54,79–82]. Literature data on co-inoculation with *Azospirillum* describe the direct influence of the microorganism on the expression of antioxidant system-related genes, as well as the action of phytohormones modulating the activity of SOD, CAT, and APX enzymes [57,78,83].

Supposedly, the mechanisms of waterlogging tolerance resulting from co-inoculation are the same as those involved in tolerance to other stresses, including biotic stresses. Indeed, co-inoculation promoted an increase in the antioxidant system in soybean plants infected by *Macrophomina phaseolina* [63] and in sunflower plants subjected to saline stress [84].

Co-inoculation with *Rhizophagus* under waterlogging conditions is certainly an alternative for promoting stress tolerance and mitigating oxidative damage. Similarly, co-inoculation with *Azospirillum* is directly related to the promotion of plant growth and improvements in responses to oxidative stress [85,86].

The plant perceives the reduction in oxygen levels in the plant root system imposed by waterlogging through a family of ethylene-responsive sensors (VII (ERF-VII)) [87]. The perception of these sensors triggers a series of signals in the plants, activating genes that promote physiological and anatomical adaptations in response to stress. Among these responses are the activation of fermentative metabolism, formation of aerenchyma, and adventitious roots [86,87]. At the same time, as the plant perceives the reduction in O₂ levels, there is also a reduction in energy production in the form of ATP generated by the electron transport chain [47]. With the lack of O₂ to receive electrons in the mitochondria, the electron flow is reduced, which not only decreases energy production but also causes alterations and accumulation of Krebs cycle intermediates, especially pyruvate, that consequently are consumed by fermentative enzyme activity, making it possible for plants to keep at least a minimum ATP production at substrate level and regenerating the NAD⁺ needed to maintain the glycolysis [87–89].

Three points stand out regarding the results of fermentative enzymes in the study. The first is the lower activity of the enzymes in co-inoculated plants (CA, CR, and CAR), suggesting that fermentative metabolism is less induced. The second point addresses the shift between alcoholic and lactic fermentation between the *a*[CO₂] and *e*[CO₂] environments. The third point refers to the lower fermentative activity in plants grown in *e*[CO₂]. The alteration between alcoholic and lactic fermentation is common in soybean plants that are either sensitive or tolerant to waterlogging, with tolerant plants exhibiting higher lactic fermentation [41]. In this study, we observed higher alcoholic fermentation in plants grown in *e*[CO₂], which may be directly related to the higher availability of carbon, as carbon is not a metabolic limiting factor under this condition.

Furthermore, plants grown in *e*[CO₂] showed better responses in the fermentative enzymes during this study. Thus, it is believed that lower activities of the enzymes LDH, PDC, ADH, and Ala-At complement the other obtained results, even though fermentative metabolism regulation is a mechanism related to the waterlogging tolerance, as plants may have adopted other mechanisms to overcome stress. This may also be related to the improvements in biometric parameters found in the roots of plants grown under *e*[CO₂]. For instance, these plants exhibited a larger stem diameter, which suggests the possible formation of aerenchyma, providing O₂ to the root cells, thus allowing minimal activity of the respiratory electron transport chain on roots, helping plants obtain better results on other analyzed variables.

Plants grown under *e*[CO₂] exhibited higher *A*, which may have resulted in greater accumulation of TSS in the roots; this result was also observed in co-inoculated plants. Co-inoculation (CA, CR, and CAR) generates a higher demand for TSS in the roots due to requiring greater exchanges between plants and microorganisms. This accumulation of TSS in the roots probably occurred before waterlogging, as evidenced by the control plants' results, as observed in the results from gas exchange under *e*[CO₂] and co-inoculations in both environments, which showed higher TSS levels. Even so, during waterlogging, TSS was reduced across all treatments. Other authors have reported related results [8,64]. During waterlogging, reductions in TSS are normal due to reductions in *A* and the use of TSS to sustain glycolytic reactions induced by the hypoxic roots' environments during waterlogging, consuming the cell's carbon stock to cope with the lack of oxygen.

It was observed that both plants grown in *e*[CO₂] and co-inoculated plants had a higher RFW. This is related to a higher accumulation of TSS in the roots, regardless of waterlogging. Nevertheless, during waterlogging, there is a reduction in RFW, as described by other researchers [29,41,64,76]. The promotion of root growth by microorganisms, whether by *Azospirillum* or *Rhizophagus*, is extensively reported in the literature and is usually explained by hormonal action and increased nutrient absorption [56,62].

The results show that a four-day reoxygenation period was insufficient to complete plant recovery, regardless of CO₂ levels in the environment, and this may be related as we have used a sensitive soybean genotype as a way to better explore possible induced tolerance by studied factors, more specifically the influence of the co-inoculation of the plants in the climate change context. However, it is possible to notice that reoxygenated plants had higher concentrations of TSS and RFW compared to the waterlogged plants. This may have occurred because control plants continued to develop, making it impossible for stressed plants to recover to the same level. Still, it is noted that plants grown in $e[CO_2]$ had a faster recovery during reoxygenation when compared to plants grown in $a[CO_2]$. This can be an advantage that C3 plants may have when carbon and nitrogen metabolism present better maintenance due to the increasing of atmospheric CO₂ and the use of co-inoculation practices in the future.

Plants co-inoculated under normal conditions exhibit higher photosynthetic rates, efficient water use, nutrient assimilation, antioxidant capacity, and better growth rates, among other important characteristics also found in plants grown in $e[CO_2]$ with or without stress influence. Thus, due to co-inoculation with the PGPB and mycorrhizae, CA, CR, and CAR and/or cultivated under $e[CO_2]$, more robust plants can better withstand waterlogging stress. The same applies during the reoxygenation period for roots, where microorganisms' co-inoculation also makes a significant difference. Thus, co-inoculating plants, especially considering an increasingly CO₂-rich environment, may help enhance plant tolerance to stress and ensure productivity under adverse conditions, especially waterlogging, as we have found.

5. Conclusions

The best responses to waterlogging were observed in co-inoculated plants grown under $e[CO_2]$. However, equivalent results were obtained with co-inoculated plants under $a[CO_2]$. Co-inoculation in soybeans improves plant performance under waterlogging conditions in a way comparable to the increase in atmospheric CO₂. However, while the increase in CO₂ has negative environmental impacts, co-inoculation is a sustainable and environmentally friendly practice. Plant growth-promoting microorganisms, in conjunction with nitrogen fixers, can mitigate the deleterious effects of waterlogging, offering benefits comparable to those promoted by elevated CO₂. Considering the challenges posed by climate change, co-inoculation emerges as a promising and sustainable alternative to mitigate the negative effects of waterlogging on plants. More studies on this topic are on course to try elucidating other aspects of co-inoculation on soybean plants facing waterlogging stress.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nitrogen5040061/s1>, Table S1. Soil characteristics. Figure S1. Atmospheric conditions of CO₂ concentrations (ambient $a[CO_2]$ or elevated $e[CO_2]$) (A), temperature (°C), and humidity during the experiment on each open-top chamber (B).

Author Contributions: Conceptualization, E.P.S., D.A.P., C.J.d.-S. and L.d.A.; methodology, E.P.S.; validation, E.P.S.; formal analysis, E.P.S., D.A.P., A.U.B., N.D.C.B. and I.R.C.; investigation, E.P.S., D.A.P. and N.D.C.B.; resources, A.C.B.d.O., L.A.d.A. and L.d.A.; data curation, E.P.S. and I.R.C.; writing—original draft preparation, E.P.S.; writing—review and editing, E.P.S. and D.A.P.; visualization, E.P.S.; supervision, D.A.P., C.J.d.-S. and L.d.A.; project administration, L.d.A.; funding acquisition, L.d.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The APC was funded by Nitrogen—MDPI.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available upon request.

Acknowledgments: We thank the NOVATERO Company for kindly providing us the *Rhizophagus intraradices*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

6. References

1. Jackson, R.B.; Le, Q.C.; Andrew, R.M.; Canadell, J.G.; Peters, G.P.; Roy, J.; Wu, L. Warning signs for stabilizing global CO₂ emissions. *Environ. Res. Lett.* **2017**, *12*, 110202. [CrossRef]
2. Ainsworth, E.A.; Long, S.P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol.* **2005**, *165*, 351–371. [CrossRef] [PubMed]
3. Canadell, J.G.; Le, Q.C.; Raupach, M.R.; Field, C.B.; Buitenhuis, E.T.; Ciais, P.; Thomas, J.C.; Nathan, P.G.; Houghton, R.A.; Gregg, M. Contributions to accelerate the growth of atmospheric CO₂ in economic activity, carbon intensity and efficiency of natural sinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18866–18870. [CrossRef] [PubMed]
4. Tans, P.; Keeling, R. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. NOAA. 2016. Available online: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends> (accessed on 10 March 2024).
5. Bernacchi, C.J.; Leakey, A.D.B.; Heady, L.E.; Morgan, P.B.; Dohleman, F.G.; Mcgrath, J.M.; Gillespie, K.M.; Wittig, V.E.; Rogers, A.; Long, S.P.; et al. Hourly and seasonal variation in photosynthesis and stomatal conductance of soybean grown at future CO₂ and ozone concentrations for 3 years under fully open-air field conditions. *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 2077–2090. [CrossRef] [PubMed]
6. Kimball, B.A. Crop responses to elevated CO₂ and interactions with H₂O, N, and temperature. *Plant Biol.* **2016**, *31*, 36–43. [CrossRef]
7. Drag, D.W.; Slattery, R.; Siebers, M.; DeLucia, E.H.; Ort, D.R.; Bernacchi, C.J. Soybean photosynthetic and biomass responses to carbon dioxide concentrations ranging from pre-industrial to the distant future. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 3690–3700. [CrossRef]
8. Ma, H.; Zhu, J.; Xie, Z.; Liu, G.; Zeng, Q.; Han, Y. Responses of rice and winter wheat to free-air CO₂ enrichment (China FACE) at rice/wheat rotation system. *Plant Soil* **2007**, *294*, 137–146. [CrossRef]
9. Wang, D.; Heckathorn, S.A.; Wang, X.; Philpott, S.M. A metaanalysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂. *Oecologia* **2012**, *169*, 1–13. [CrossRef]
10. Parvin, S.; Uddin, S.; Bourgault, M.; Roessner, U.; Tausz-Posch, S.; Armstrong, R.; O'Leary, G.; Fitzgerald, G.; Tausz, M. Water availability moderates N₂ fixation benefit from elevated [CO₂]: A 2-year free-air CO₂ enrichment study on lentil (*Lens culinaris* Medik.) in a water limited agroecosystem. *Plant Cell Environ.* **2018**, *41*, 2418–2434. [CrossRef]
11. Rogers, A.; Ainsworth, E.A.; Leakey, A.D. Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes? *Plant Physiol.* **2009**, *151*, 1009–1016. [CrossRef]
12. Kant, S.; Seneweera, S.; Rodin, J.; Materne, M.; Burch, D.; Rothstein, S.J.; Spanenberg, G. Improving yield potential in crops under elevated CO₂: Integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 162. [CrossRef] [PubMed]
13. Aranjuelo, I.; Arrese-Igor, C.; Molero, G. Nodule performance within a changing environmental context. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, 1076–1090. [CrossRef] [PubMed]
14. Lam, S.K.; Chen, D.; Norton, R.; Armstrong, R. Does phosphorus stimulate the effect of elevated [CO₂] on growth and symbiotic nitrogen fixation of grain and pasture legumes? *Crop Pasture Sci.* **2012**, *63*, 53–62. [CrossRef]
15. Li, Y.; Yu, Z.; Liu, X.; Mathesius, U.; Wang, G.; Tang, C.; Jin, J. Elevated CO₂ increases nitrogen fixation at the reproductive phase contributing to various yield responses of soybean cultivars. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1546. [CrossRef] [PubMed]
16. Hungate, B.A.; Stiling, P.D.; Dijkstra, P.; Johnson, D.W.; Ketterer, M.E.; Hymus, G.J.; Hinkle, R.C.; Drake, B.G. CO₂ elicits long-term decline in nitrogen fixation. *Science* **2004**, *304*, 1291. [CrossRef]
17. Reich, P.B.; Hobbie, S.E.; Lee, T.; Ellsworth, D.S.; West, J.B.D.; Tilman, J.M.H.; Knops, S.; Naeem, J. TrostNitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* **2006**, *440*, 922–925. [CrossRef]
18. van Groenigen, K.J.; Six, J.; Hungate, B.A.; de Graaff, M.A.; Van Breemen, N.; Van Kessel, C. Element interactions limit soil carbon storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6571–6574. [CrossRef]
19. Moretti, L.G.; Crusciol, C.A.C.; Bossolani, J.W.; Momesso, L.; Garcia, A.; Kuramae, E.E.; Hungria, M. Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2020**, *20*, 1923–1934. [CrossRef]
20. Musyoka, D.M.; Njeru, E.M.; Nyamwange, M.M.; Maingi, J.M. Arbuscular mycorrhizal fungi and coinoculation of *Bradyrhizobium* increase nitrogen fixation and the growth of green grasses (*Vigna radiata* L.) under water stress. *J. Plant Nutr.* **2020**, *43*, 1036–1047. [CrossRef]
21. Vergara, C.; Araujo, K.E.C.; Souza, S.R.D.; Schultz, N.; Saggin Júnior, O.J.; Sperandio, M.V.L.; Zilli, J.É. Interação da planta com fungo micorrízico e sua resposta à inoculação com diferentes fungos promotores de crescimento. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2018**, *54*, e25140. [CrossRef]
22. Jilkova, V.; Sim, A.; Thornton, B.; Jandová, K.; Cajthaml, T.; Paterson, E. Impact of plant species and atmospheric CO₂ concentration on rhizodeposition and soil microbial activity and community composition. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2020**, *183*, 327–337. [CrossRef]

23. Voesenek, L.A.C.J.; Sasidharan, R. Ethylene-and oxygen signalling-drive plant survival during waterlogging. *Plant Biol.* **2013**, *15*, 426–435. [CrossRef] [PubMed]
24. Van Dongen, J.T.; Licausi, F. Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2015**, *66*, 345–367. [CrossRef] [PubMed]
25. Garcia, N.; da-Silva, C.J.; Cocco, K.L.T.; Pomagualli, D.; de Oliveira, F.K.; da Silva, J.V.L.; de Oliveira, A.C.B.; do Amarante, L. Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through different physiological and biochemical mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *172*, 103975. [CrossRef]
26. Fukami, J.; de la Osa, C.; Ollero, F.J.; Megías, M.; Hungria, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Funct. Plant Biol.* **2018**, *45*, 328–339. [CrossRef]
27. Palit, P.; Kudapa, H.; Zougmore, R.; Kholova, J.; Whitbread, A.; Sharma, M.; Varshney, R.K. An integrated research framework combining genomics, systems biology, physiology, modelling and breeding for legume improvement in response to elevated CO₂ under climate change scenario. *Curr. Plant Biol.* **2020**, *22*, 100149. [CrossRef]
28. Rondina, A.B.L.; dos Santos Sanzovo, A.W.; Guimarães, G.S.; Wendling, J.R.; Nogueira, M.A.; Hungria, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with A. *brasilense* exudates. *Biol. Fertil. Soils* **2020**, *56*, 537–549. [CrossRef]
29. Richter, G.L.; Zanon, A.; Streck, N.A.; Guedes, J.V.C.; Kräulich, B.; da Rocha, T.S.M.; Winck, J.E.M.; Cera, J.C. Estimating leaf area of modern soybean cultivars by a non-destructive method. *Bragantia* **2014**, *73*, 416–425. [CrossRef]
30. Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of diferente resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 307–313. [CrossRef]
31. Velikova, V.; Yordanov, I.; Edreva, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* **2000**, *151*, 59–66. [CrossRef]
32. Cakmak, I.; Horst, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* **1991**, *83*, 463–468. [CrossRef]
33. Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **1977**, *59*, 309–314. [CrossRef] [PubMed]
34. Azevedo, R.A.; Alas, R.M.; Smith, R.J.; Lea, P.J. Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* **1998**, *66*, 280–292. [CrossRef]
35. Nakano, Y.; Asada, K.H. Peroxide is Scavenged by Ascorbatespecific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **1981**, *22*, 867–880. [CrossRef]
36. Hanson, A.D.; Jacobsen, J.V.; Zwar, J.A. Regulated Expression of Three Alcohol Dehydrogenase Genes in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 573–581. [CrossRef]
37. Hanson, A.D.; Jacobsen, J.V. Control of Lactate Dehydrogenase, Lactate Glycolysis, and α -Amylase by O₂ Deficit in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 566–572. [CrossRef]
38. Good, A.G.; Muench, D.G. Purification and Characterization of an Anaerobically Induced Alanine Aminotransferase from Barley Roots. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1520–1525. [CrossRef]
39. Bielecki, R.L.; Turner, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* **1966**, *17*, 278–293. [CrossRef]
40. Graham, D.; Smydzuk, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 246–255. [CrossRef]
41. Posso, D.A.; da-Silva, C.J.; Shimoia, E.P.; da Silva Martins, T.; Reissig, G.N.; de Oliveira, A.C.B.; Borela, J.; van Dogen, T.J.; do Amarante, L. Root-hypoxia tolerance in soybean sister-lines plants indicates a better balance in energy use/dissipation and oxidative stress control. *Plant Stress* **2023**, *10*, 100225. [CrossRef]
42. Maurel, C.; Boursiac, Y.; Luu, D.T.; Santoni, V.; Shahzad, Z.; Verdoucq, L. Aquaporins in plants. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1321–1358. [CrossRef] [PubMed]
43. Thomas, D.S. The end game(s) of photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol.* **2024**, *195*, 67–78. [CrossRef]
44. do Amarante, L.; Lima, J.D.; Sodek, L. Alterations of xylem transport of key metabolic products of assimilatory activity in soybean: Do similar alterations occur in roots and nodules? *Acta Physiol. Plant* **2022**, *44*, 11. [CrossRef]
45. Vitor, S.C.; Sodek, L. Products of anaerobic metabolism in waterlogged roots 978 of soybean are exported in the xylem. *Plant Sci.* **2019**, *284*, 82–90. [CrossRef] [PubMed]
46. da Silva Martins, T.; Da-Silva, C.J.; Shimoia, E.P.; Posso, D.A.; Carvalho, I.R.; de Oliveira, A.C.B.; do Amarante, L. Nitrate supply decreases fermentation and alleviates oxidative and ionic stress in nitrogen-fixing soybean exposed to saline waterlogging. *Funct. Plant Biol.* **2023**, *50*, 416–433. [CrossRef]
47. Da-Silva, C.J.; Shimoia, E.P.; Posso, D.A.; Cardoso, A.A.; Batz, T.A.; Oliveira, A.C.B.; do Amarante, L. Nitrate nutrition increases foliar levels of nitric oxide and waterlogging tolerance in soybean. *Acta Physiol. Plant.* **2021**, *43*, 116. [CrossRef]
48. da-Silva, C.J.; do Amarante, L. Short-term nitrate supply decreases fermentation and oxidative stress caused by waterlogging in soybean plants. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *176*, 104078. [CrossRef]
49. Tewari, S.; Arora, N.K. Soybean production under waterlogging stress and its mitigation using plant growth-promoting microbes. In *Environmental Stresses in Soybean Production*; Miransari, M., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 2016; Volume 2, pp. 23–40. [CrossRef]

50. Shimoia, E.P.; Da-Silva, C.J.; Posso, D.A.; da Silva Martins, T.; Agualongo, D.A.P.; de Oliveira, A.C.B.; do Amarante, L. Co-inoculation of Seeds with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and *Rhizophagus* Improves Nitrogen Assimilation and Growth in Soybean Plants Subjected to Waterlogging. *Russ. J. Plant Physiol.* **2023**, *70*, 146. [CrossRef]
51. Ruiz-Lozano, J.M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **2003**, *13*, 309–317. [CrossRef]
52. Zawoznik, M.S.; Ameneiros, M.; Benavides, M.P.; Vázquez, S.; Groppa, M.D. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1389–1397. [CrossRef]
53. Chibeba, A.M.; de Fátima Guimarães, M.; Brito, O.R.; Nogueira, M.A.; Araujo, R.S.; Hungria, M. Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* Promotes Early Nodulation. *Am. J. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1641–1649. [CrossRef]
54. Younesi, O.; Moradi, A.; Namdari, A. Influence of arbuscular mycorrhiza on osmotic adjustment compounds and antioxidant enzyme activity in nodules of salt-stressed soybean (*Glycine max*). *Acta Agric. Slov.* **2013**, *101*, 219. [CrossRef]
55. Birhane, E.; Sterck, F.J.; Fetene, M.; Bongers, F.; Kuyper, T.W. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* **2012**, *169*, 895–904. [CrossRef]
56. Stoffel, S.C.G.; Meyer, E.; Lovato, P.E. Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Afr. J. Agric. Res.* **2020**, *16*, 702–713.
57. Fukami, J.; Ollero, F.J.; de la Osa, C.; Valderrama-Fernández, R.; Nogueira, M.A.; Megías, M.; Hungria, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 1191–1203. [CrossRef]
58. Sardans, J.; Rivas-Ubach, A.; Peñuelas, J. The C: N: P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *14*, 33–47. [CrossRef]
59. Yang, Y.; Liu, B.R.; An, S.S. Ecological stoichiometry in leaves, roots, litters and soil among different plant communities in a desertified region of Northern China. *Catena* **2018**, *166*, 328–338. [CrossRef]
60. Da-Silva, C.J.; do Amarante, L. Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *180*, 104242. [CrossRef]
61. Kim, K.H.; Cho, M.J.; Kim, J.M.; Lee, T.; Heo, J.H.; Jeong, J.Y.; Lee, J.; Moon, J.K.; Kang, S. Growth response and developing simple test method for waterlogging stress tolerance in soybean. *J. Crop Sci. Biotechnol.* **2019**, *22*, 371–378. [CrossRef]
62. Juge, C.; Prévost, D.; Bertrand, A.; Bipfubusa, M.; Chalifour, F.P. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Appl. Soil Ecol.* **2012**, *61*, 147–157. [CrossRef]
63. Spagnoletti, F.N.; Cornero, M.; Chiochio, V.; Lavado, R.S.; Roberts, I.N. Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *156*, 839–849. [CrossRef]
64. Agualongo, D.A.P.; Da-Silva, C.J.; Garcia, N.; de Oliveira, F.K.; Shimoia, E.P.; Posso, D.A.; de Oliveira, A.C.B.; Colares, D.S.O.; do Amarante, L. Waterlogging priming alleviates the oxidative damage, carbohydrate consumption, and yield loss in soybean (*Glycine max*) plants exposed to waterlogging. *Funct. Plant Biol.* **2022**, *49*, 1029–1042. [CrossRef] [PubMed]
65. Wang, X.; Huang, M.; Zhou, Q.; Cai, J.; Dai, T.; Cao, W.; Jiang, D. Physiological and proteomic mechanisms of waterlogging priming improves tolerance to waterlogging stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *132*, 175–182. [CrossRef]
66. Rhodes, D.; Nadolska-Orczyk, A. Plant stress physiology. In *Encyclopaedia of Life Sciences*; Nature Publishing Group: New York, NY, USA, 2001. [CrossRef]
67. Liu, Y.; Gao, S.; Hu, Y.; Zhang, T.; Guo, J.; Shi, L.; Li, M. Comparative study of leaf nutrient reabsorption by two different ecotypes of wild soybean under low-nitrogen stress. *PeerJ* **2023**, *11*, e15486. [CrossRef]
68. Chieb, M.; Gachomo, E.W. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biol.* **2023**, *23*, 407. [CrossRef]
69. Tsavkelova, E.A.; Klimova, S.Y.; Cherdyntseva, T.A.; Netrusov, A.I. Produtores microbianos de estimuladores de crescimento de plantas e seu uso prático: Uma revisão. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2006**, *42*, 117–126. [CrossRef]
70. Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* **2012**, *2012*, 963401. [CrossRef]
71. Syvash, O.O.; Zolotareva, O.K. Regulation of chlorophyll degradation in plant tissues. *Biotechnol. Acta* **2017**, *10*, 20–30. [CrossRef]
72. Sewelam, N.; Kazan, K.; Schenk, P.M. Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 187. [CrossRef]
73. Gong, Z.; Duan, Y.; Liu, D.; Zong, Y.; Zhang, D.; Shi, X.; Hao, X.; Li, P. Physiological and transcriptome analysis of response of soybean (*Glycine max*) to cadmium stress under elevated CO₂ concentration. *J. Hazard. Mater.* **2023**, *448*, 130950. [CrossRef]
74. Zheng, G.; Chen, J.; Li, W. Impacts of CO₂ elevation on the physiology and seed quality of soybean. *Plant Divers.* **2020**, *42*, 44–51. [CrossRef] [PubMed]
75. Shabbaj, I.I.; AbdElgawad, H.; Balkhyour, M.A.; Tammar, A.; Madany, M.M. Elevated CO₂ differentially mitigated oxidative stress induced by indium oxide nanoparticles in young and old leaves of C3 and C4 crops. *Antioxidants* **2022**, *11*, 308. [CrossRef] [PubMed]
76. de Oliveira, F.K.; Da-Silva, C.J.; Garcia, N.; Agualongo, D.A.P.; de Oliveira, A.C.B.; Kanamori, N.; Takasaki, H.; Urano, K.; Shinozaki, K.; Nakashima, K.; et al. The overexpression of NCED results in waterlogging sensitivity in soybean. *Plant Stress* **2022**, *3*, 100047. [CrossRef]

77. Khalafallah, A.A.; Abo-Ghalia, H.H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. *J. Appl. Sci. Res.* **2008**, *4*, 559–569.
78. Fukami, J.; Cerezini, P.; Hungria, M. *Azospirillum*: Benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express* **2018**, *8*, 73. [CrossRef]
79. Fukami, J.; Ollero, F.J.; Megías, M.; Hungria, M. Phytohormones and induction of plant stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* **2017**, *7*, 153. [CrossRef]
80. Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 541–556. [CrossRef]
81. Gamalero, E.; Berta, G.; Glick, B.R. The Use of Microorganisms to Facilitate the Growth of Plants in Saline Soils. In *Microbial Strategies for Crop Improvement*; Khan, M., Zaidi, A., Musarrat, J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009. [CrossRef]
82. Wang, C.J.; Yang, W.; Wang, C.; Gu, C.; Niu, D.D.; Liu, H.X.; Wang, Y.P.; Guo, J.H. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52565. [CrossRef]
83. Upadhyay, S.K.; Singh, J.S.; Saxena, A.K.; Singh, D.P. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biol.* **2012**, *14*, 605–611. [CrossRef]
84. Zakikhani, H.; Ardakani, M.R.; Rejali, F.; Gholamhoseini, M.; Joghian, A.K.; Dolatabadian, A. Influence of diazotrophic bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of soybean subjected to water stress. *J. Integr. Agric.* **2012**, *11*, 1828–1835. [CrossRef]
85. Yasmeen, T.; Ahmad, A.; Arif, M.S.; Mubin, M.; Rehman, K.; Shahzad, S.M.; Iqbal, S.; Rizwan, M.; Ali, S.; Alyemeni, M.N.; et al. Biofilm forming rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *156*, 242–256. [CrossRef] [PubMed]
86. Barros, F.C.; De Camargo, R.; Lana, R.M.Q.; Franco, M.H.R.; Stanger, M.C.; Pereira, V.J.; Lemes, E.M. *Azospirillum brasilense* and organomineral fertilizer co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* oxidative stress in soybean. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* **2022**, *11*, 229–245. [CrossRef]
87. Pucciariello, C.; Boscari, A.; Tagliani, A.; Brouquisse, R.; Perata, P. Exploring legume-rhizobia symbiotic models for waterlogging tolerance. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 578. [CrossRef] [PubMed]
88. Kim, Y.H.; Hwang, S.J.; Waqas, M.; Khan, A.L.; Lee, J.H.; Lee, J.D.; Nguyen, H.T.; Lee, I.J. Comparative analysis of endogenous hormones level in two soybean (*Glycine max* L.) lines differing in waterlogging tolerance. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 714. [CrossRef] [PubMed]
89. António, C.; Pöpke, C.; Rocha, M.; Diab, H.; Limami, A.M.; Obata, T.; Fernie, A.R.; van Dongen, J.T. Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 43–56. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO II - Co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* mitigates the deleterious effects of waterlogging in soybean plants in a scenario of enhanced atmospheric CO₂

Eduardo Pereira Shimoia¹, Douglas Antônio Posso¹, Cristiane Jovelina da-Silva², Adriano Udich Bester¹, Nathalia Dalla Corte Bernardi¹, Ivan Ricardo Carvalho, Ana Claudia Barneche de Oliveira, Luis Antonio de Avila⁵ and Luciano do Amarante¹

¹ Botanic Department, Federal University of Pelotas, Capão do Leão 96010-610, RS, Brazil; adriano.udich.bester@gmail.com (A.U.B.); nathaliadcbernardi@gmail.com (N.D.C.B.); lucianoamarante@yahoo.com.br (L.d.A.)

² Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA; cjdasilv@ncsu.edu

³ Department of Agricultural Studies, Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul, Ijuí 98700-000, RS, Brazil; carvalho.irc@gmail.com

⁴ Embrapa Temperate Agriculture, Brazilian Agricultural Research Corporation, Pelotas 96010-971, RS, Brazil; ana.barneche@embrapa.br

⁵ Department of Plant Soil Sciences, Mississippi State University, Starkville, MS 39762, USA; luis.avila@pss.msstate.edu

* Correspondence: eduardopshimoia@gmail.com (E.P.S.); douglasposso@hotmail.com (D.A.P.); Tel.: +55-53981034124 (D.A.P.)

ABSTRACT

Rising atmospheric CO₂ concentrations directly influence photosynthesis and productivity in C₃ plants, contributing to global warming and altering hydrological cycles, which in turn increase extreme rainfall events. Soybean, a waterlogging-sensitive crop, exhibits marked yield reductions under such conditions. Legumes establish symbioses with diazotrophic bacteria and are increasingly co-inoculated with plant growth-promoting bacteria (PGPB) to enhance stress resilience. While elevated CO₂ (e[CO₂]) and PGPB generally stimulate photosynthesis and growth, waterlogging often counteracts these benefits by intensifying photorespiratory activity. This study investigated the effects of *Bradyrhizobium* inoculation (IB) and co-inoculation with *Azospirillum brasilense* (CA) on soybean carbon and nitrogen metabolism under waterlogging and e[CO₂] (750 μmol mol⁻¹ vs. ambient 420 μmol mol⁻¹). At the V4 stage, plants were subjected to seven days of waterlogging followed by four days of drainage. Measurements included gas exchange, glycolate oxidase (GO), glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT), and biometric traits. e[CO₂] significantly enhanced gas exchange, an effect further amplified by CA. The synergistic interaction between e[CO₂] and CA improved photosynthetic performance during both stress and recovery. GO activity was reduced under CA and e[CO₂], though it increased transiently under waterlogging. Waterlogging upregulated GS-GOGAT activity, which returned to baseline after the post-drainage. Under e[CO₂], GS-GOGAT activity declined, but CA maintained higher activity than IB. Co-inoculated plants improved the growth metrics under all conditions, with e[CO₂] further enhancing performance. Overall, e[CO₂] improved photosynthesis and suppressed photorespiration, while CA mitigated waterlogging-induced

photorespiratory stress and preserved nitrogen metabolism. These results demonstrate that co-inoculation with *Azospirillum* and e[CO₂] synergistically enhances soybean resilience to waterlogging, offering a sustainable strategy for climate-smart agriculture.

Keywords: CO₂ assimilation, diazotrophic bacteria, Glycine max, Hypoxia, nitrogen assimilation.

1. INTRODUCTION

Atmospheric CO₂ concentrations are projected to reach ~800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ by the end of this century, accompanied by significant global warming and altered precipitation patterns (IPCC, 2023). Higher temperatures and more erratic, intense rainfall events threaten soybean productivity, as heat stress and waterlogging both reduce yields (Heino et al., 2023; Posso et al., 2023; Posso et al., 2025). Soybean is a rainfed crop in many regions and thus particularly vulnerable to climate-driven extremes (Rogers et al., 2009). Under future scenarios, expansion of areas prone to transient or prolonged soil saturation is expected, intensifying yield losses (Voisenek & Bailey-Serres, 2013; global estimates: ~17 million km² currently prone to waterlogging; climate change likely to expand these zones into agricultural lands).

Waterlogging reduces gas diffusion in saturated soils, leading to root hypoxia and impaired respiration. This induces a switch to fermentative metabolism and inhibits biological nitrogen fixation in legume nodules (Borella et al., 2017; do Amarante et al., 2022). In soybean, root hypoxia rapidly limits water and nutrient uptake and triggers systemic responses, including stomatal closure, which reduces CO₂ assimilation and biomass accumulation (da Silva et al., 2020/2021). Energy deficits in roots and nodules disrupt the GS-GOGAT (glutamine synthetase – glutamate synthase) cycle and nitrogen metabolism, further compromising growth under waterlogging (do Amarante et al., 2022; Oliveira et al., 2002).

Under waterlogging, photorespiration in leaves often increases due to stomatal closure limiting CO₂, while O₂ diffusion remains relatively unimpeded, raising the internal O₂/CO₂ ratio around RuBisCO and enhancing oxygenase activity (Yin et al., 2016; Posso et al., 2018). Although photorespiration can serve protective roles—dissipating excess energy and avoiding photoinhibition—its reliance on enzymes such as glycolate oxidase (GO) and the GS-GOGAT system links carbon and nitrogen metabolism and incurs a considerable energetic cost (Oliveira et al., 2002). Under water stress, increased photorespiration persists even as net CO₂ assimilation declines (Mustroph and Albrecht, 2003).

The GS-GOGAT cycle is essential for ammonium assimilation and amino acid synthesis. Under waterlogging, energy shortages, and halted nitrogen fixation in nodules impair GS-GOGAT activity in roots and nodules (do Amarante et al., 2022; Borella et al., 2017). In shoots, however, GS-GOGAT may act as a “metabolic snorkel,” refixing photorespiratory ammonium and recycling organic acids to support survival under hypoxia (Vitor et al., 2019). Upon reoxygenation, restoration of

oxidative phosphorylation and nodule function can reactivate photosynthesis and nitrogen metabolism, but a transient burst of reactive oxygen species during reoxygenation may induce oxidative damage if defenses are insufficient (Borella et al., 2017; do Amarante et al., 2022; Garcia et al., 2020; Posso et al., 2023).

Elevated atmospheric CO₂ enhances photosynthetic carbon assimilation, increasing carbohydrate supply to roots and symbionts, which can bolster biological nitrogen fixation and growth under non-stress conditions (Rogers et al., 2009; Ainsworth & Long, 2005). However, under waterlogging, the benefits of elevated CO₂ may be offset by root hypoxia unless additional strategies support root/rhizosphere function. Co-inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) such as *Azospirillum brasilense* has been shown to improve root development, modulate ethylene via 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity, enhance antioxidant defenses, and support stress resilience (Juge et al., 2012; Fukami et al., 2018). In soybean, *Azospirillum* can enhance nitrogen fixation, even under suboptimal conditions, by promoting nodule function and mitigating waterlogging effects (Shimoia et al., 2023).

Given these insights, we hypothesized that elevated CO₂ reduces waterlogging-induced photorespiration in soybean leaves, while co-inoculation with *Azospirillum* sustains GS-GOGAT activity and nitrogen metabolism under root hypoxia. We further propose that the combination of e[CO₂] and *Azospirillum* co-inoculation acts synergistically to enhance gas exchange, energy balance, and biomass recovery after drainage. To test this, we evaluated gas exchange variables, GO and GS-GOGAT enzyme activities, and biometric traits in soybean inoculated with *Bradyrhizobium* alone or co-inoculated with *Azospirillum*, grown under ambient vs. elevated CO₂, and subjected to waterlogging stress followed by drainage.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant Material, Growth Conditions, and Treatments

Soybean seeds of the waterlogging-sensitive cultivar PEL BR 157060, kindly provided by EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation), were surface-sterilized by immersion in 80% ethanol for 2 minutes, followed by 10% (w/v) sodium hypochlorite for an additional 2 minutes. Seeds were then thoroughly rinsed with sterile distilled water for 5 minutes to remove any disinfectant residues. Cultivar sensitivity was confirmed in EMBRAPA experimental fields based on growth and yield assessments (data not shown) and physiological measurements (Posso et al., 2023).

Following sterilization, seeds were subjected to microorganisms treatments as follows: (I) *Bradyrhizobium* inoculation (IB): seeds were treated with *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019) and *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) at a concentration of 4 mL per kg of seeds, containing 5×10^9 colony-forming units (CFU) mL⁻¹; (II) Co-inoculation (CA): seeds were inoculated with *Bradyrhizobium* strains as above, plus *Azospirillum brasilense* (strains Ab-V5 and Ab-V6) at 2 mL per

kg of seeds, with a final concentration of 2×10^8 CFU mL⁻¹ (Fig. 1).

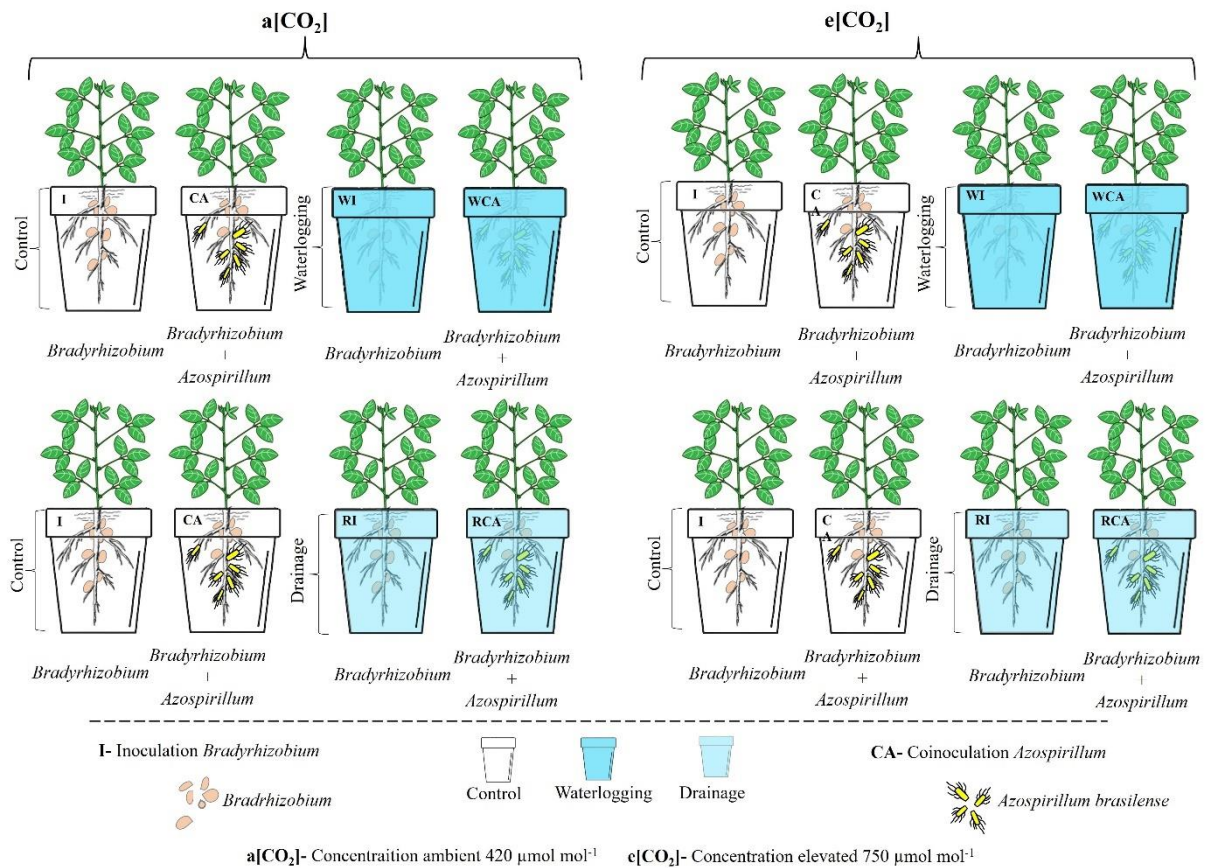


Figure 1. Schematic representation of the experimental design. Soybean plants were grown under two atmospheric CO₂ conditions — ambient CO₂ (a[CO₂]) and elevated CO₂ (e[CO₂]) — and inoculated with either *Bradyrhizobium* alone (IB) or co-inoculated with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* (CA). Plants were subjected to waterlogging for seven days, followed by a four-day drainage period.

After 60 minutes of microorganism adherence, eight seeds per treatment were sown in 3 L plastic pots filled with lowland soil, previously collected from the field site (31°48'26.21"S, 52°28'48.20"W). The soil was sterilized by autoclaving it at 127°C and 1.5 atm for 90 minutes. Before sowing, it was chemically amended to meet soybean nutritional requirements following the Brazilian Manual of Fertilization and Liming (see Table 1 for detailed soil chemistry). To adjust pH, 3.75 g of limestone (75 % total neutralization power) was applied per pot 30 days before sowing. No nitrogen fertilizer was added to permit nodulation, and native soil nutrient levels were sufficient for baseline productivity.

These lowland soils are predominantly Planosols, with a light-colored, sandy surface horizon over a planic B horizon of medium-to-high clay content, grayish from recurring redox processes under poor drainage (Klamt et al., 1985). Gleysols develop under water saturation and show a gray glei horizon (Zanon et al., 2018). As a result, they have low effective depth, high bulk density, low porosity (high micro- to macropore ratio), poor drainage, low aeration, and slow water infiltration.

Table 1: Chemical characteristics of the soil used in the experiment.

Ca	Mg	Al	K	H+Al	CTC effective	CTC pH 7	pH wader
cmol/dm ³							
0.1	1.1	0.5	0.18	2.8	1.9	4.2	4.9
K	Cu	Zn	Mn	Na	P-Mehlich	Index SMP	Clay class
mg/dm ³							
72	0.7	1.6	44	4	92	6.4	4
Molar Relations			MO %	Clay %	Saturation %		Fe %
Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	m/v		Al	Bases	
0.09	0.56	6.11	1.38	14	26	33	0.09

Pots were placed in two Open Top Chambers (OTCs), one maintained under ambient CO₂ conditions (a[CO₂]: 420 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and the other under elevated CO₂ (e[CO₂]: 750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) (Fig. 1). Following the emergence of the unifoliate leaf pair, seedlings were thinned to two plants per pot. Each pot was treated as a single experimental unit, with the two plants per pot pooled to generate one composite sample for analysis. Four biological replicates were included per treatment.

At the V4 developmental stage (five nodes and four fully expanded trifoliate; Fehr & Caviness, 1977), plants were subjected to waterlogging for seven consecutive days by submerging the pots in water-filled containers, maintaining a 4 cm water layer above the soil surface. This was followed by a four-day drainage period. During drainage, pot weights were recorded daily to estimate water retention. Control (non-waterlogged) pots stabilized at an average weight of 3.300 kg (pot + soil + water + plant), while waterlogged pots retained higher moisture, averaging 4.300 kg. Residual soil moisture remained slightly elevated in the waterlogged treatments after drainage due to the low permeability of the soil (Fig. 2).

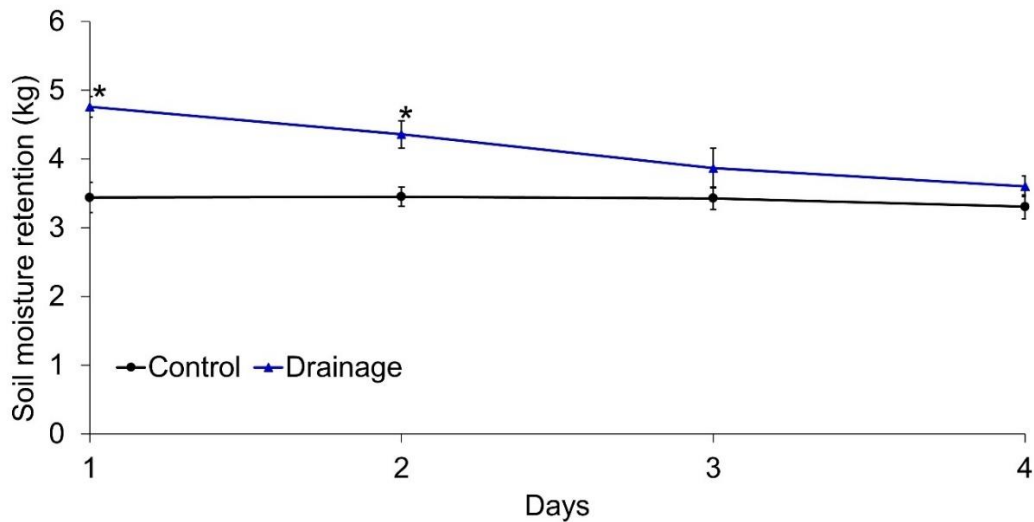


Figure 2. Monitoring of soil moisture retention during the drainage period, irrespective of CO₂ concentration or microbial treatment. Asterisks indicate significant differences between control and drained plants (*t*-test; *P* < 0.05).

The experiment was conducted during the optimal planting window defined by the agricultural zoning for soybean cultivation in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Environmental conditions were not supplemented with artificial light or temperature control. Temperature, relative humidity (Fig. 3), and CO₂ concentration (Fig. 4) within each OTC were monitored twice daily (06:30 and 19:30 h). Daily averages were calculated based on the diurnal period only, excluding nighttime values when photosynthetic activity is minimal.

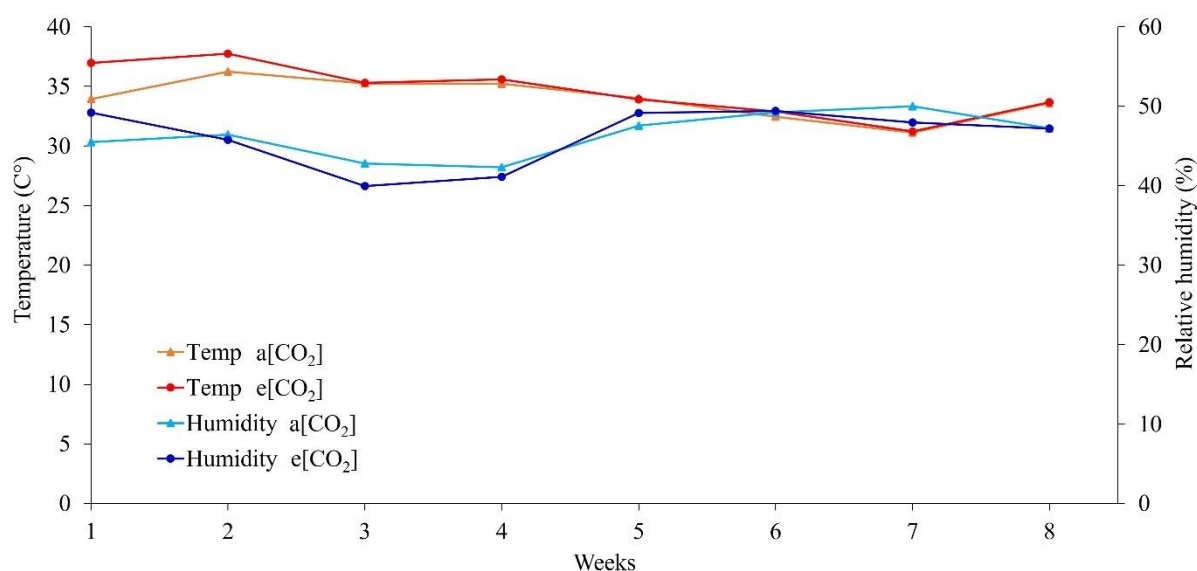


Figure 3. Monitoring of temperature and relative humidity within Open-Top Chambers (OTCs) during the experimental period. Orange line: temperature in a[CO₂] OTC; red line: temperature in e[CO₂] OTC. Light blue line: relative humidity in a[CO₂]; dark blue line: relative humidity in e[CO₂].

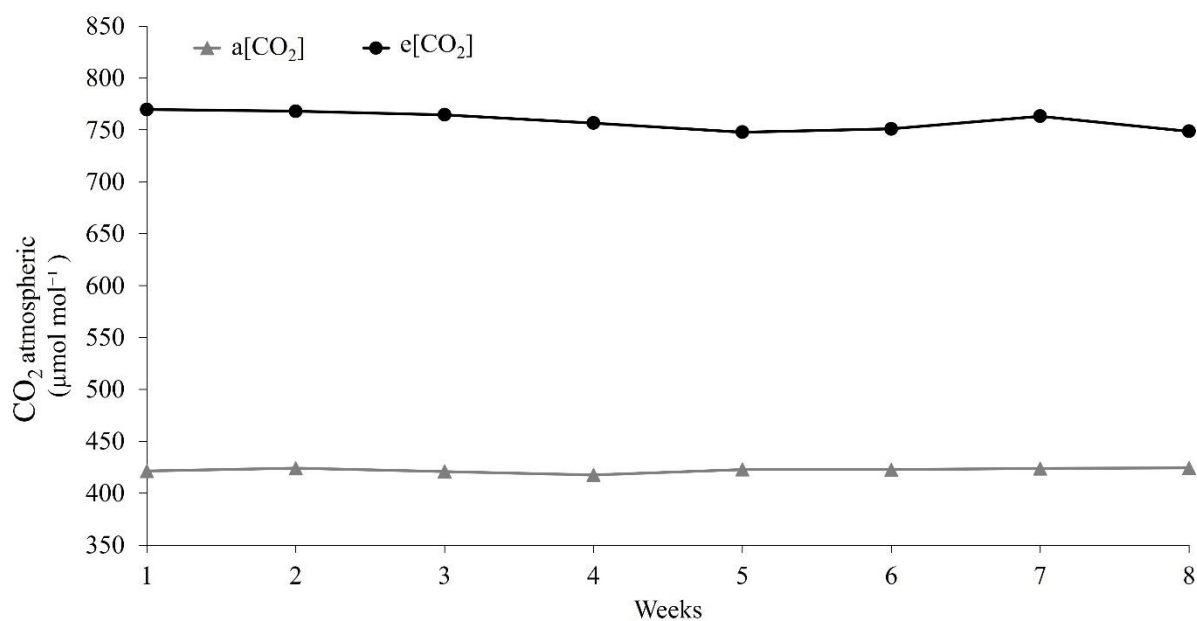


Figure 4. Monitoring of CO₂ levels (μmol mol⁻¹) within Open-Top Chambers during the experiment. Gray line: ambient CO₂ treatment (a[CO₂]); black line: elevated CO₂ treatment (e[CO₂]).

2.2. Gas Exchange, Plant Growth, and Biomass Accumulation

Gas exchange measurements were performed on intact, fully expanded young trifoliolate leaves (first fully developed leaf) using a portable infrared gas analyzer (LI-6400XT, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Measurements were taken between 08:00 and 10:00 h at the end of the waterlogging period and again following drainage. The system was set to operate under ambient ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($750 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 concentrations, matching the respective treatment conditions. A constant photosynthetic photon flux density of $1,250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was provided by an integrated light source (LI-COR 6400-02B), and the leaf chamber block temperature ($2 \times 3 \text{ cm}$) was maintained at 25°C throughout the measurement period.

At the end of the waterlogging and drainage phases, the following biometric variables were recorded: (I) Stem Diameter (SD): Measured at the stem base using a digital caliper; Root Dry Weight (RDW): Roots were excised, and RDW was determined after oven-drying at 65°C until constant mass; (IV) Root Volume (RV): Estimated via water displacement using a graduated cylinder; (V) Shoot Dry Weight (SDW): Determined using the same procedure as for root biomass.

2.3. Enzyme Activity Assays

2.3.1 Glycolate Oxidase (GO; EC 1.1.3.1)

Leaves (0.250 g) were homogenized in liquid nitrogen with 25% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP) and 2 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 0.01% Triton X-100 and 5 mM dithiothreitol. The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatant was used to measure GO activity via glyoxylate-phenylhydrazine formation (extinction coefficient: $17 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Absorbance at 324 nm was recorded every 10 s for 3 min in a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.009% Triton X-100, 3.3 mM phenylhydrazine HCl (pH 6.8), and 5 mM glycolate (pH 7.0) (Bai et al., 2014).

2.3.2 Glutamine Synthetase (GS; EC 6.3.1.2)

Leaves (0.300 g) were homogenized in liquid nitrogen with 25% (w/v) PVPP and 1.5 mL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 2.5 mM MgSO_4 , 2.5 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 0.25 mM EDTA, 1% β -mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, and 1% glycerol. The homogenate was centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was desalted using a Sephadex G-25 column (PD-10, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Enzyme activity was assayed in 400 μ L of reaction medium containing 150 μ L of desalted extract, 0.8 mM imidazole buffer, 384 mM hydroxylamine, 320 mM MgCl_2 , 160 mM sodium glutamate, and 400 mM ATP. After 30 min incubation at 30°C, the reaction was stopped with 600 μ L of stop reagent (0.67 M HCl, 370 mM FeCl_3 , 200 mM trichloroacetic acid). GS activity was quantified at 535 nm via γ -glutamyl hydroxamate formation (Cullimore et al., 1982).

2.3.3 Ferredoxin-Glutamate Synthase (Fd-GOGAT; EC 1.4.1.7)

An aliquot from the same extract used for GS determination was assayed. The reaction medium contained 400 mM potassium phosphate (pH 7.5), 56 mM L-glutamine, 48 mM 2-oxoglutarate, 64 mM methyl viologen, and 100 μ L of enzyme extract. After 5 min incubation at 25°C, 25 μ L of reducing agent (300 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + 600 mM NaHCO_3 , v/v) was added, and the reaction was incubated for an additional 20 min. The reaction was terminated with 250 μ L of methanol and vortexed. Glutamate content was quantified at 506 nm after anion-exchange chromatography using a Dowex acetate 200-400 mesh column (Matoh et al., 1979).

2.4. Experimental Design and Statistical Analysis

Pots were arranged in a completely randomized design within the growth chambers. Each pot (two plants) constituted an experimental unit, with four replicates per treatment. Control groups (non-waterlogged plants) were included for both waterlogged and drained conditions. The enzyme assay was performed in duplicates for each experimental unit, and the result was based on the average of these duplicates. Prior to analysis, the data were checked for normality (Shapiro–Wilk test) and for homogeneity, not needing treatments. Subsequently, statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA). When significant differences were detected via the F-test in ANOVA, means among treatments (as indicated in the figure titles) were compared using the t-test at a significance level of $P < 0.05$. The statistical analyses were carried out using R (4.4.3) statistical software program. Furthermore, the data were exported to the MetaboAnalyst web-based platform (<http://www.metaboanalyst.ca/>) for additional analysis. Filters based on standard deviations were applied solely for auto-scaling the data. The data were subjected to Principal Component Analysis (PCA) to differentiate the treatments based on the formation of groups and correlations for clustering treatments.

3. RESULTS

During the experiment, soybean plants grown under elevated CO₂ (e[CO₂]) became increasingly distinct from those under ambient CO₂ (a[CO₂]), with treatment effects most pronounced by the end of the trial. Specifically, e[CO₂] plants exhibited significantly greater height and expanded leaf area compared to a[CO₂] plants. They also maintained higher photosynthetic pigments—as evidenced by their deeper green coloration—and experienced less leaf abscission following waterlogging and subsequent drainage. Representative visual differences among treatments are shown in Figure 5, seven days after waterlogging and four days after drainage.

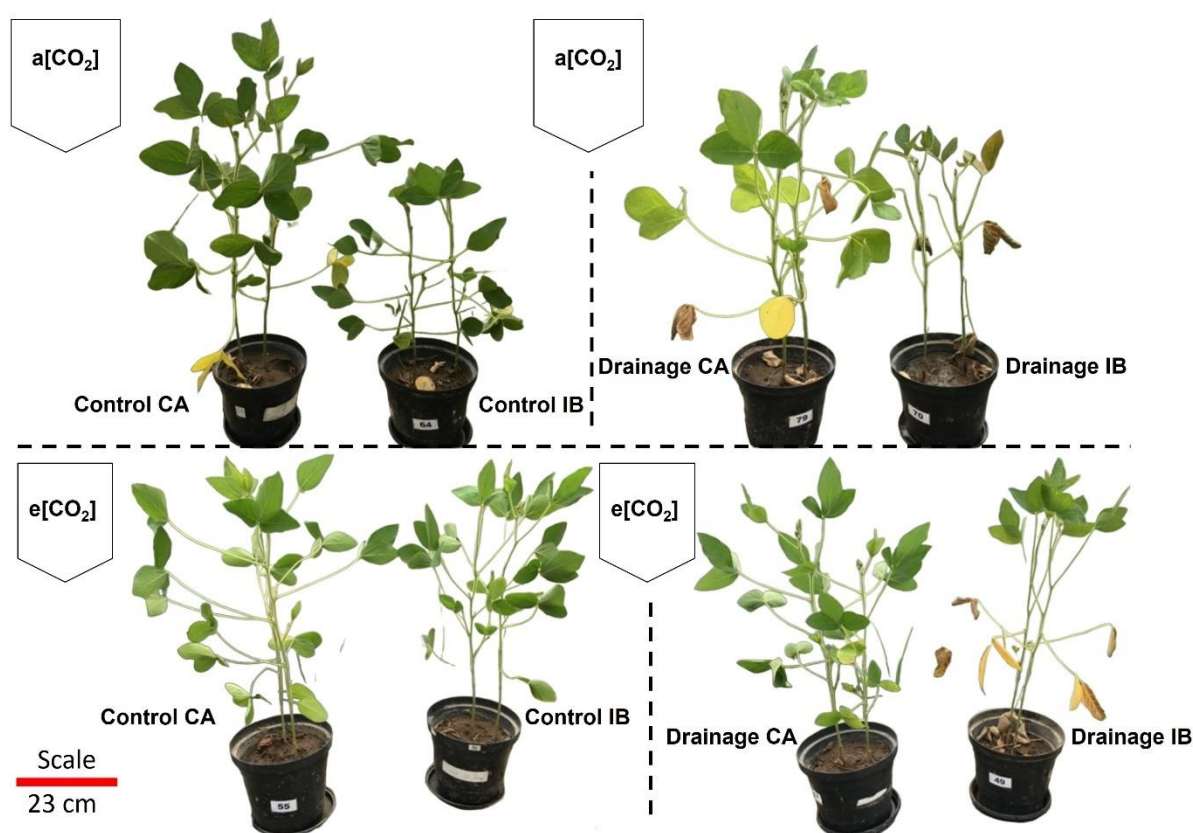


Figure 5. Waterlogging-sensitive soybean plants (cultivar PELBR15–7060) grown under ambient (a[CO₂]) or elevated CO₂ (e[CO₂]) conditions, with different symbiotic associations, and subjected to waterlogging for seven days followed by a four-day drainage period. CCA: control plants under CA treatment; CIB: control plants under IB treatment; RCA: drained plants under CA treatment; RIB: drained plants under IB treatment. IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

3.1. Effects of e[CO₂] and CA on soybean gaseous exchange under waterlogging

Elevated atmospheric CO₂ concentration (e[CO₂]) consistently enhanced net photosynthetic rate (*A*), independent of waterlogging or co-inoculation treatments (Fig. 6A). Under ambient CO₂ (a[CO₂]) and non-stress conditions, inoculated-but-not-co-inoculated (IB)

plants exhibited A values 16% lower than co-inoculated (CA) counterparts. This difference was exacerbated under waterlogging. Conversely, under e[CO₂], IB plants displayed a 20% reduction in A compared to CA plants, with waterlogging further decreasing A in IB plants. Notably, CA plants maintained elevated A levels under e[CO₂], even during waterlogging. Comparing plants under a[CO₂] and e[CO₂], A increased by 10% in IB and 13% in CA under control conditions. Following drainage CA plants recovered A to pre-waterlogging levels; however, IB plants in a[CO₂] retained a 36% lower A than those in e[CO₂], while CA plants under a[CO₂] exhibited a 49% reduction relative to their e[CO₂] counterparts. During drainage, IB plants in a[CO₂] and e[CO₂] showed 27% and 40% lower A , respectively, compared to drained CA plants.

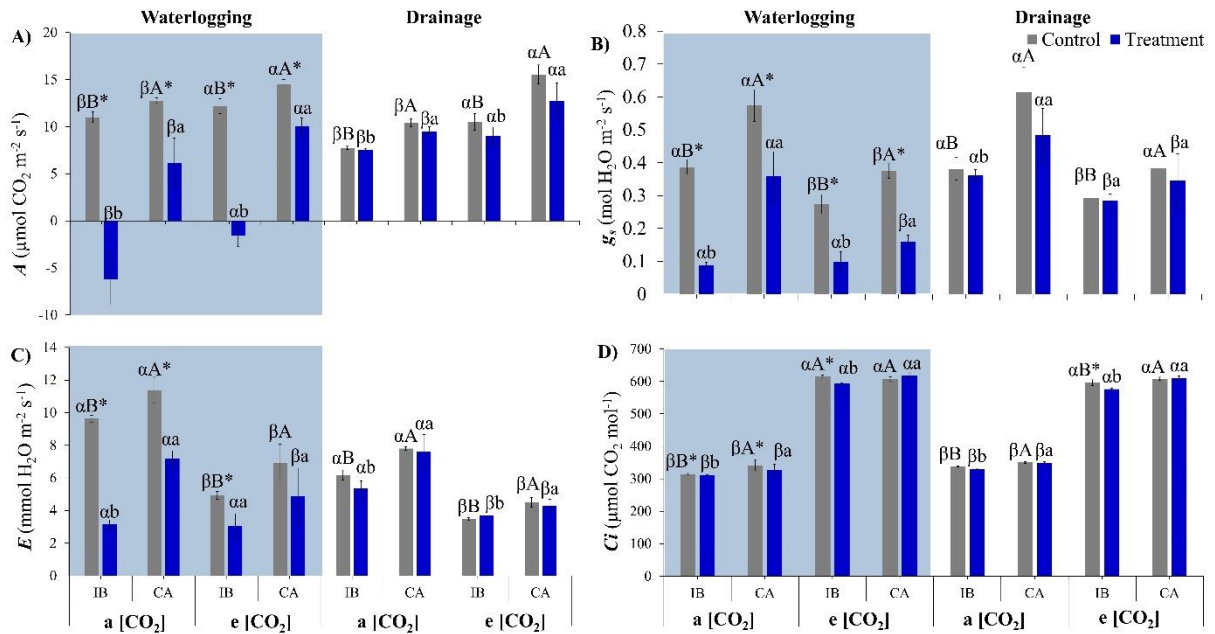


Figure 6. Net CO₂ assimilation rate (A) (A), stomatal conductance (g_s) (B), transpiration (E) (C), and intercellular CO₂ concentration (C_i) (D) in waterlogging-sensitive soybean plants (PELBR15–7060) cultivated under different CO₂ concentrations (ambient [CO₂], a[CO₂], or elevated [CO₂], e[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by drainage (four days). Values represent mean $\pm$ SD, $n = 4$. Asterisks indicate significant differences between control and waterlogged/drained plants (t -test; $P < 0.05$). Uppercase letters denote differences among treatments under control conditions; lowercase letters denote differences under waterlogging or drainage; Greek letters denote differences between a[CO₂] and e[CO₂] treatments (t -test; $P < 0.05$). IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

Stomatal conductance (g_s) declined under e[CO₂] across all treatments (Fig. 6B). Under control conditions in a[CO₂], IB plants showed g_s values 50% lower than CA. Waterlogging further reduced g_s in IB plants, whereas CA plants maintained g_s at nearly fourfold higher levels. Under e[CO₂], g_s in IB plants was 37% lower than in CA, and 51% lower under waterlogging. Relative to a[CO₂], g_s decreased by 29% in IB and 35% in CA

under control conditions. By the end of drainage, IB and CA plants recovered g_s to control levels, yet remained lower under $e[CO_2]$. IB plants in $a[CO_2]$ displayed 23% higher g_s than under $e[CO_2]$; for CA, the difference reached 37%. During drainage, IB plants exhibited 34% ($a[CO_2]$) and 21% ($e[CO_2]$) lower g_s than respective CA plants.

Importantly, under $a[CO_2]$, CA plants exhibited gas exchange variables (A and g_s) comparable to IB plants grown under $e[CO_2]$, particularly under control and drained conditions. Under waterlogging, the benefits of co-inoculation and elevated CO_2 were diminished, yet CA plants still maintained higher g_s , suggesting enhanced foliar gas exchange under stress.

Transpiration rate (E) was consistently lower under $e[CO_2]$, even during waterlogging (Fig. 6C). Under control conditions in $a[CO_2]$, E in IB plants was 18% lower than in CA. Waterlogging reduced E in IB plants, while CA plants maintained values threefold higher. Under $e[CO_2]$, E in IB plants was 40% lower than CA, but under waterlogging, E in IB plants was unexpectedly 59% higher than in CA. Comparing CO_2 levels, control IB and CA plants under $e[CO_2]$ exhibited 48% and 39% lower E , respectively, than under $a[CO_2]$. Upon drainage, transpiration returned to baseline levels. However, IB and CA plants under $a[CO_2]$ still showed 43% higher E than their $e[CO_2]$ counterparts. During drainage, E in IB plants was 43% ($a[CO_2]$) and 17% ($e[CO_2]$) lower than in CA.

Intercellular CO_2 concentration (C_i) increased significantly under $e[CO_2]$, regardless of waterlogging (Fig. 6D). On average, C_i was 87% higher in plants under $e[CO_2]$ than in those under $a[CO_2]$. Within $a[CO_2]$, CA plants had 6% higher C_i than IB plants; this difference disappeared under $e[CO_2]$. During drainage, C_i in $e[CO_2]$ -grown plants remained 75% higher than in $a[CO_2]$ plants, indicating a sustained impact of elevated CO_2 on internal carbon availability.

3.2. Effects of $e[CO_2]$ and CA on soybean photorespiratory metabolism under waterlogging

Enzymes involved in photorespiration and nitrogen assimilation—glycolate oxidase (GO), glutamine synthetase (GS), and ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT)—were modulated by atmospheric CO_2 concentration, waterlogging, and co-inoculation (Fig. 7).

Under control conditions in ambient CO_2 ($a[CO_2]$), IB plants exhibited GO activity 14% higher than CA plants (Fig. 7A). Waterlogging further stimulated GO activity in both CA and IB, but IB plants displayed 20% higher activity than CA. In contrast, under elevated

CO₂ (e[CO₂]), GO activity decreased sharply, with IB and CA plants showing reductions of 71% and 68%, respectively, compared to their counterparts in a[CO₂]. Waterlogging led to a partial recovery of GO under e[CO₂], yet activity in waterlogged CA plants remained 30% lower than in IB. During drainage, GO activity in CA plants returned to control levels, while IB plants retained significantly elevated activity. For both CA and IB, GO activity under a[CO₂] was over 70% higher than under e[CO₂], with the greatest differences observed in drained plants. Notably, during recovery, IB plants in a[CO₂] showed 12% higher GO activity than CA, whereas this difference narrowed to only 2% under e[CO₂]. Significant differences were found between waterlogged and control plants, and between IB and CA under waterlogged conditions, regardless of CO₂.

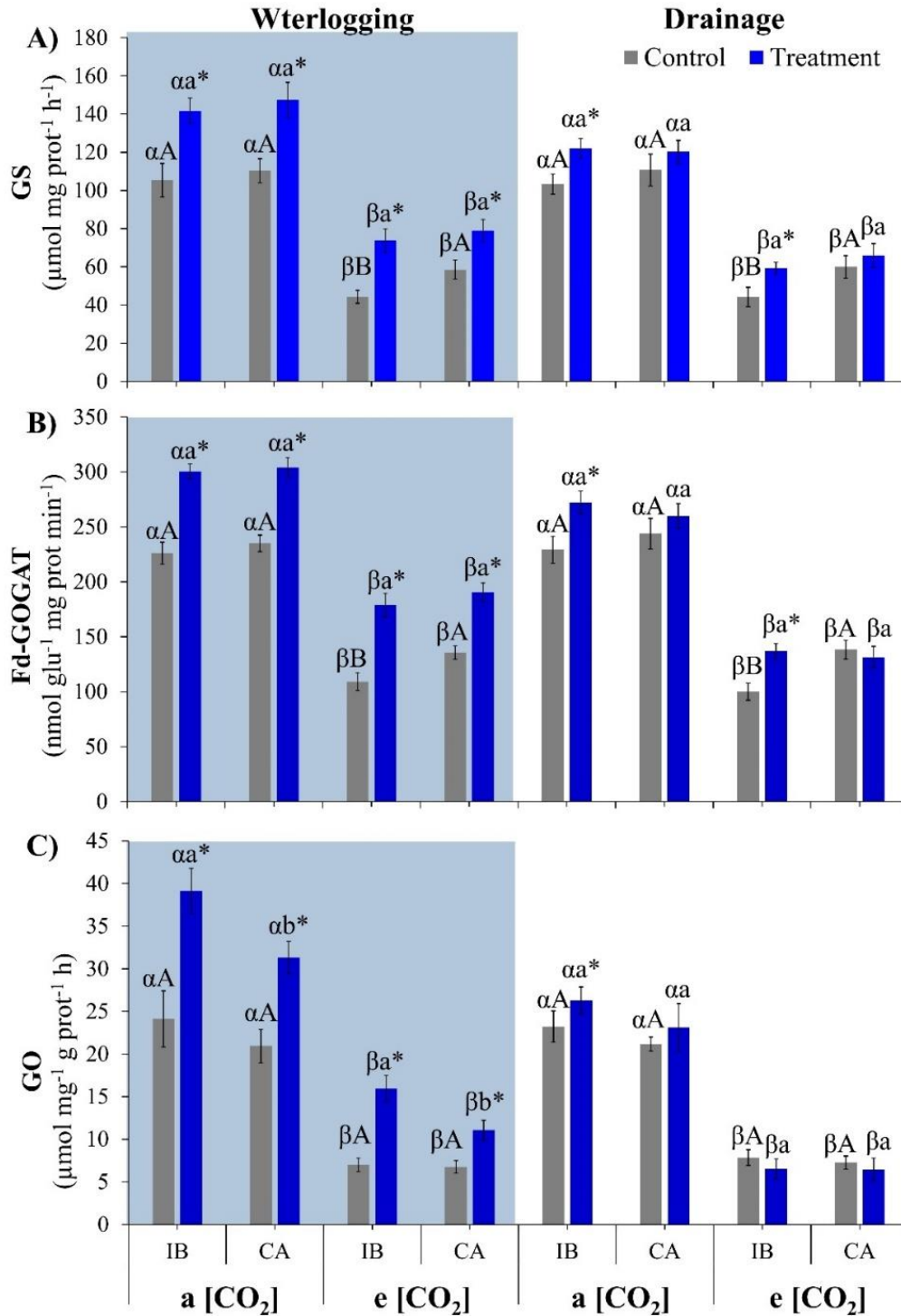


Figure 7. Enzymatic activity of glutamine synthetase (GS) (A), glutamate synthase (GOGAT) (B), and glycolate oxidase (GO) (C) in leaves of waterlogging-sensitive soybean plants (PELBR15-7060) cultivated under different CO₂ concentrations (ambient [CO₂], a[CO₂], or elevated [CO₂], e[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by drainage (four days). Values represent mean ± SD, *n* = 4. Asterisks indicate significant differences between control and waterlogged/drainage plants (*t*-test; *P* < 0.05). Uppercase letters denote differences among treatments under control conditions; lowercase letters denote differences under waterlogging or drainage; Greek letters denote differences between a[CO₂] and e[CO₂] treatments (*t*-test; *P* < 0.05). IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

Under control $a[CO_2]$, IB plants exhibited 5% lower GS activity than CA (Fig. 7B). Waterlogging increased GS activity in both CA and IB, with CA maintaining a 4% advantage. Under $e[CO_2]$, GS activity declined by 58% in IB and 47% in CA plants relative to their respective $a[CO_2]$ controls. Waterlogging partially restored GS activity under $e[CO_2]$, although waterlogged CA plants still had 7% higher activity than IB. After drainage, CA plants returned to baseline GS levels, while IB plants remained suppressed, especially under $e[CO_2]$. Under $a[CO_2]$, IB plants showed 57% higher GS activity than in $e[CO_2]$; for CA, the difference was 46%. During recovery, IB plants in $a[CO_2]$ had only 2% lower GS activity than CA, while under $e[CO_2]$, they exhibited 11% lower activity. Statistically significant effects were detected between waterlogged and control plants, as well as between IB and CA under $e[CO_2]$.

Fd-GOGAT activity also followed this trend (Fig. 7C). Under ambient CO_2 ($a[CO_2]$), IB plants exhibited slightly (~4 %) lower activity than CA plants. Waterlogging induced activity in both CA and IB, with CA plants reaching slightly higher values (+1%). Under $e[CO_2]$, however, Fd-GOGAT activity was reduced by 52% in IB and 42% in CA compared to $a[CO_2]$. Waterlogging under $e[CO_2]$ promoted partial recovery, yet CA plants maintained 7% higher activity than IB. During drainage, CA plants recovered control levels across CO_2 treatments, while IB plants under $e[CO_2]$ remained suppressed. IB plants in $a[CO_2]$ had 56% higher activity than in $e[CO_2]$; in CA plants, this difference was 43%. At the final stage, recovering IB plants in $a[CO_2]$ exhibited 4% lower Fd-GOGAT activity than CA, and under $e[CO_2]$, both CA and IB displayed similar reductions (-4%). As with GO and GS, statistical differences were primarily observed between waterlogged and control plants and between IB and CA in $e[CO_2]$.

Collectively, these findings demonstrate that waterlogging enhances photorespiratory and nitrogen metabolism regardless of CO_2 levels, while elevated CO_2 exerts a suppressive effect on enzymatic activity. Co-inoculation partially offsets this inhibition and supports metabolic resilience, particularly during recovery from waterlogging.

3.3. Effects of $e[CO_2]$ and CA on soybean biometric variables under waterlogging

Biometric variables—shoot dry weight (SDW), stem diameter (SD), root volume (RV), and root dry weight (RDW)—were significantly influenced by CO_2 concentration, co-inoculation, and waterlogging (Figs. 8 and 9).

Under control conditions at ambient CO_2 ($a[CO_2]$), IB plants exhibited 18% lower SDW than CA plants (Fig. 8A). Waterlogging exacerbated this reduction, with IB plants

showing 37% lower SDW than waterlogged CA. Under elevated CO₂ (e[CO₂]), SDW increased for both IB and CA, though IB plants still presented 20% lower values than CA. Waterlogging reduced SDW in both, but CA plants maintained a 23% advantage over IB. Comparing CO₂ conditions, SDW was 66% (IB) and 69% (CA) higher in e[CO₂] than in a[CO₂]. After drainage, IB and CA plants in e[CO₂] retained higher SDW values than in a[CO₂] by 63% and 51%, respectively. Notably, during recovery, IB plants in a[CO₂] had 34% lower SDW than CA, while in e[CO₂], the difference was 24%, confirming the consistent benefit of co-inoculation and elevated CO₂.

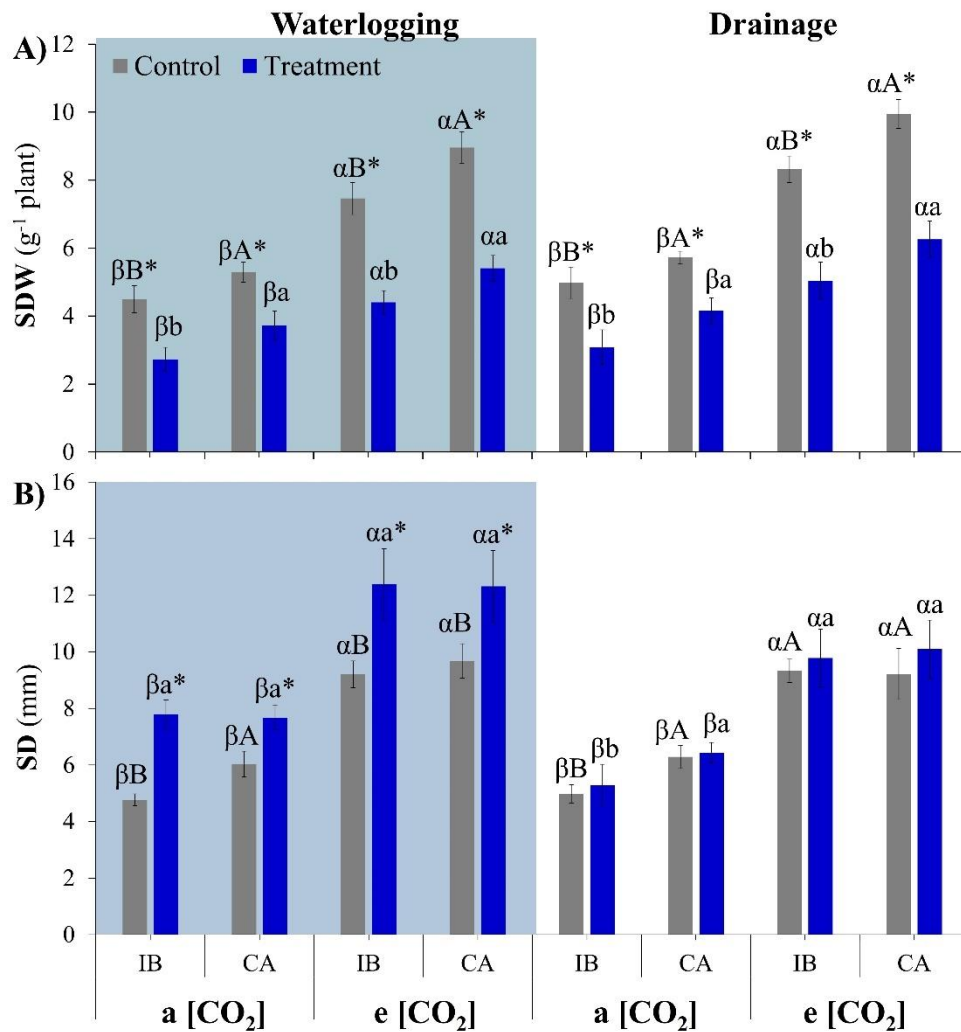


Figure 8. Shoot dry weight (SDW) accumulation (A) and stem diameter (SD) (B) in waterlogging-sensitive soybean plants (PELBR15–7060) cultivated under different CO₂ concentrations (ambient [CO₂], a[CO₂], or elevated [CO₂], e[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by drainage (four days). Values represent mean ± SD, $n = 4$. Asterisks indicate significant differences between control and waterlogged/drained plants (t -test; $P < 0.05$). Uppercase letters denote differences among treatments under control conditions; lowercase letters denote differences under waterlogging or drainage; Greek letters denote differences between a[CO₂] and e[CO₂] treatments (t -test; $P < 0.05$). IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

Stem diameter followed a similar trend (Fig. 8B). Under a[CO₂], IB plants had SD 26% lower than CA. Waterlogging reduced this gap, with IB and CA plants differing by only 1%. Under e[CO₂], IB plants had 5% lower SD than CA, a pattern maintained under waterlogging. Comparing CO₂ treatments, SD increased by 93% (IB) and 60% (CA) under e[CO₂]. After drainage, SD in IB plants was 85% higher in e[CO₂] than a[CO₂]; for CA, the increase was 57%. During recovery, IB plants in a[CO₂] exhibited 22% lower SD than CA, whereas in e[CO₂], the difference narrowed to 3%, suggesting that elevated CO₂ minimized genotypic differences in stem robustness.

Root volume was also strongly affected (Fig. 9A). Under control conditions, IB plants in a[CO₂] environment exhibited RV 27% lower than CA. Waterlogging intensified this difference to 39%. Under e[CO₂], RV increased substantially, although IB plants remained 14% below CA. Waterlogging slightly reduced RV in both CA and IB, yet CA maintained a 16% advantage. When comparing CO₂ conditions, RV was 70% (IB) and 52% (CA) higher under e[CO₂] than a[CO₂]; for waterlogged plants, this increase reached 113% in IB and 77% in CA. After drainage, RV remained higher in e[CO₂] plants by 100% (IB) and 77% (CA). During recovery, IB plants in a[CO₂] displayed 40% lower RV than CA, and 20% lower than CA under e[CO₂], confirming the benefits of elevated CO₂ and co-inoculation on root development.

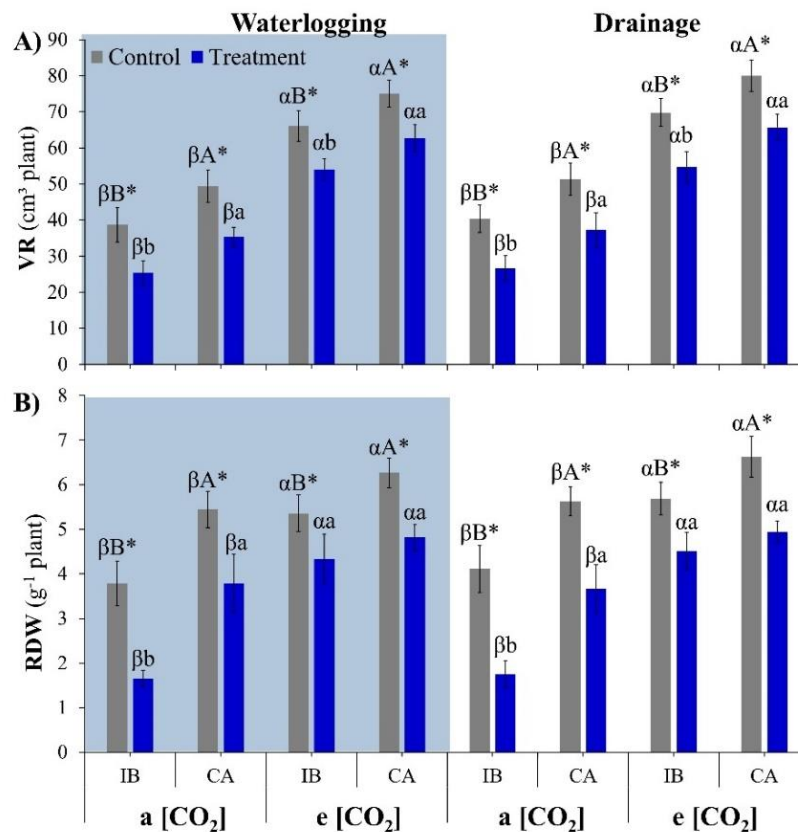


Figure 9. Root system volume (VR) (A) and root dry weight (RDW) accumulation (B) in waterlogging-sensitive soybean plants (PELBR15–7060) cultivated under different CO₂ concentrations (ambient [CO₂], a[CO₂], or elevated [CO₂], e[CO₂]) with different symbiotic associations and subjected to waterlogging (seven days) followed by drainage (four days). Values represent mean $\pm$ SD, $n = 4$. Asterisks indicate significant differences between control and waterlogged/drained plants (t -test; $P < 0.05$). Uppercase letters denote differences among treatments under control conditions; lowercase letters denote differences under waterlogging or drainage; Greek letters denote differences between a[CO₂] and e[CO₂] treatments (t -test; $P < 0.05$). IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

For root dry weight (Fig. 9B), IB plants under a[CO₂] had 44% lower values than CA in control conditions. Under waterlogging, RDW in IB was 129% lower (2.29 $\times$ less) than in CA. Under e[CO₂], RDW increased in both CA and IB, with IB still 17% lower than CA. Waterlogged IB plants showed lower RDW than CA by 11%, despite the beneficial effect of CO₂. Comparing CO₂ treatments, RDW was 41% (IB) and 15% (CA) higher in e[CO₂] under control conditions; under waterlogging, these differences increased to 162% (IB) and 27% (CA). After drainage, RDW in IB plants remained 159% lower in a[CO₂] compared to e[CO₂]; for CA, the reduction was 35%. During recovery, IB plants in a[CO₂] exhibited 110% (2.1 $\times$) lower RDW than CA; in e[CO₂], the difference was limited to 9%.

Overall, elevated CO₂ markedly enhanced all biometric variables, particularly in co-inoculated (CA) plants. Waterlogging reduced growth traits across CA and IB and conditions, but the negative effects were significantly mitigated under e[CO₂]. Co-inoculation consistently improved performance under both ambient and elevated CO₂, suggesting additive or synergistic effects on soybean resilience and biomass accumulation.

3.4. Multivariate Analysis

Under a[CO₂], the first principal component (Dimension 1, 73.6 % of variance) clearly separates CA from IB treatments (Fig. 10A). CA treatments cluster on the right side of Dim 1, driven by higher values of A , g_s , C_i , SDW and SD. In contrast, IB treatments—particularly Waterlogging_IB, Drainage_IB and Control_w_IB—lie on the left, reflecting their lower contributions to these variables. Along the second axis (Dim 2, 15.1 % of variance), subtle vertical separations occur: SD and Fd-GOGAT load positively for CA, while GO and Waterlogging_IB load negatively, indicating additional variation in enzyme activity and morphological traits that Dim 1 does not capture.

Under e[CO₂], Dimension 1 accounts for 64 % of variance but shows more overlap between CA and IB ellipses (Fig. 10B). Although A , g_s , C_i , SDW and SD remain the primary drivers of group arrangement, their discriminating power is reduced—IB and CA treatments are less distinctly partitioned along Dim 1. Dimension 2 (21.2 % of variance) again provides

secondary separation: Waterlogging_CA and Control_w_CA plot higher, suggesting enhanced physiological adaptation under stress, whereas Drainage_IB and Control_d_IB plot lower, hinting at residual limitations in the IB group even after recovery. Overall, the greatest treatment discrimination occurs under a[CO₂], driven by leaf gas-exchange and growth variables, whereas under e[CO₂] the groups converge, reflecting the mitigating effect of elevated CO₂ on genotypic differences.

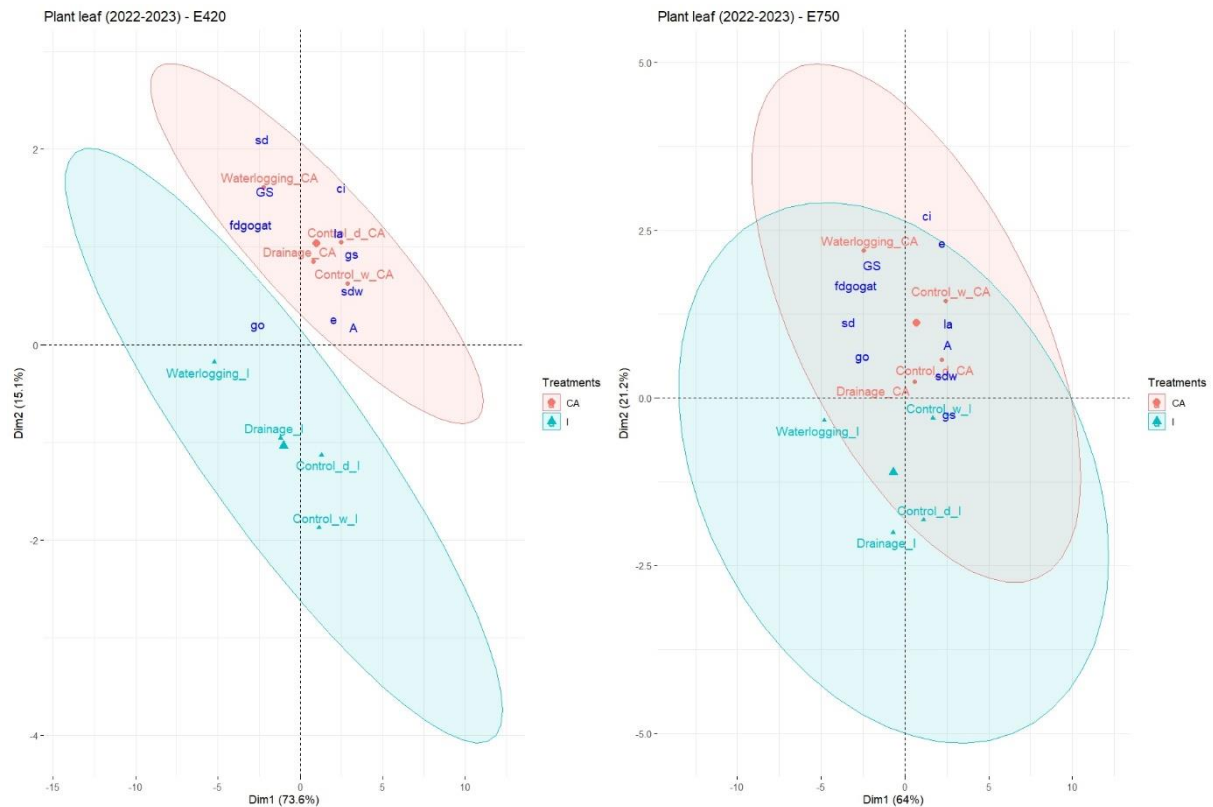


Figure 10. Principal component analysis (PCA) based on PC1 and PC2, derived from morphophysiological and biochemical traits in the shoots of waterlogging-sensitive soybean plants (cultivar PELBR15–7060) grown under ambient (a[CO₂]) or elevated (e[CO₂]) CO₂ concentrations, with different symbiotic associations, and subjected to waterlogging for seven days followed by a four-day drainage period. I: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*.

Heatmap analysis (Figure 11) separated treatments into four clusters. Photorespiratory enzymes (GO, GS, GOGAT) were significantly higher in flooded plants, especially in a[CO₂]. Co-inoculation (CA) reduced GO activity but increased GS and GOGAT under flooding. Stomatal conductance (g_s) and transpiration (E) were severely reduced in a[CO₂] plants, while e[CO₂] and CA maintained higher A . SDW and C_i were positively influenced by e[CO₂] and CA, despite flooding-induced reductions.

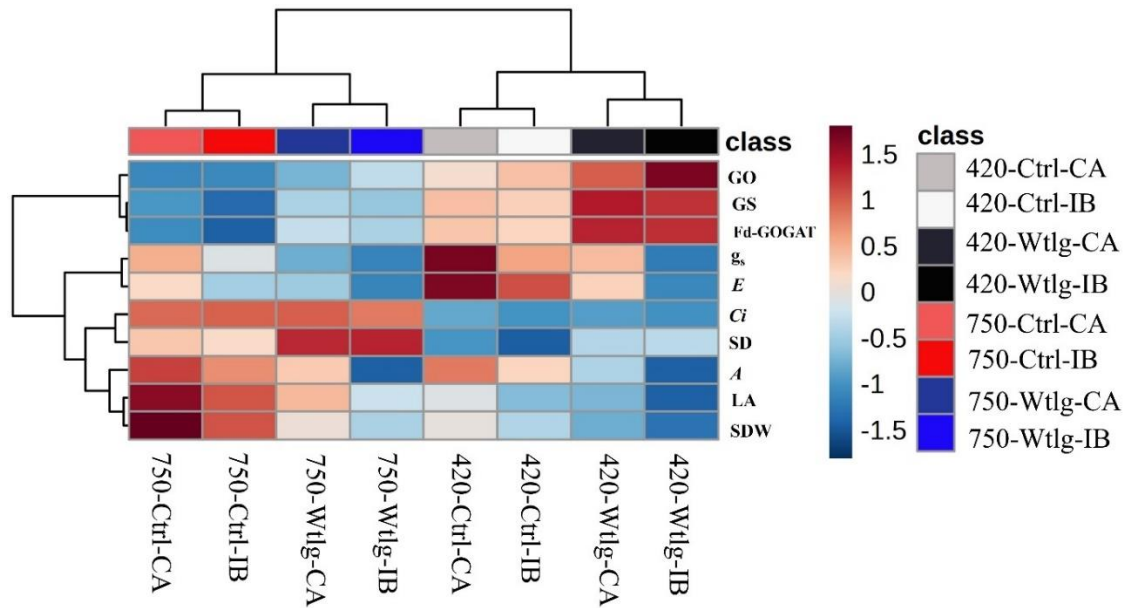


Figure 11. Heatmap of enzymatic activities (GS, GOGAT, GO), gas exchange variables (A , C_i , E , g_s), and shoot biometric traits (SDW, LA, SD) in waterlogging-sensitive soybean plants (cultivar PELBR15–7060) grown under ambient ($a[CO_2]$) or elevated ($e[CO_2]$) CO_2 concentrations, with different symbiotic associations, and subjected to waterlogging for seven days followed by a four-day drainage period. IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*. Blue-to-red color gradients ($\log_{10}$ scale) represent relative increases and decreases, respectively. Color codes: white = $a[CO_2]$ control; black = $a[CO_2]$ waterlogged; red = $e[CO_2]$ control; blue = $e[CO_2]$ waterlogged.

During drainage (Figure 12), treatments clustered into two groups: flooded vs. drained. Drained CA plants in $e[CO_2]$ exhibited high A , C_i , and SDW, while CA controls in $a[CO_2]$ retained higher g_s and E . GO remained reduced under $e[CO_2]$ and CA, but GS and GOGAT persisted, indicating sustained nitrogen metabolism despite lower photorespiration.

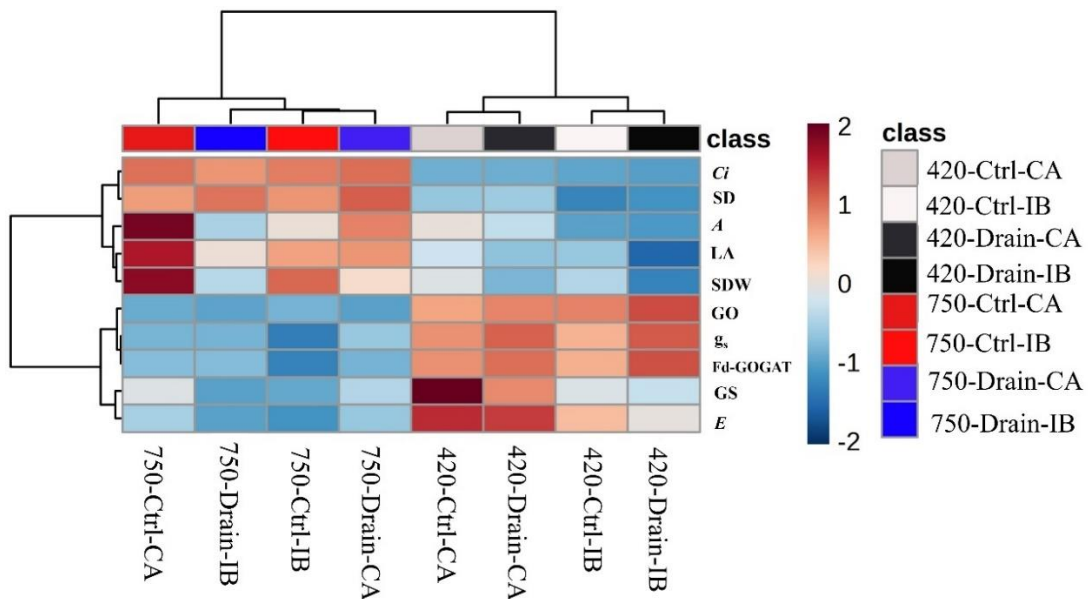


Figure 12. Heatmap of enzymatic activities (GS, GOGAT, GO), gas exchange variables (A , C_i , E , g_s), and shoot biometric traits (SDW, LA, SD) in waterlogging-sensitive soybean plants (cultivar

PELBR15–7060) grown under ambient ($a[\text{CO}_2]$) or elevated ($e[\text{CO}_2]$) CO_2 concentrations, with different symbiotic associations, and subjected to waterlogging for seven days followed by a four-day reoxygenation (drainage) period. IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*. Blue-to-red color gradients ($\log_{10}$ scale) indicate relative increases and decreases, respectively. Color codes: white = $a[\text{CO}_2]$ control plants; black = $a[\text{CO}_2]$ reoxygenated plants; red = $e[\text{CO}_2]$ control plants; blue = $e[\text{CO}_2]$ reoxygenated plants.

Root analysis (Figure 13) showed no distinct clusters. $e[\text{CO}_2]$ and CA improved root volume (RV) and RDW under flooding. During drainage (Figure 14), treatments overlapped due to recovery, but $e[\text{CO}_2]$ and CA still enhanced root growth.

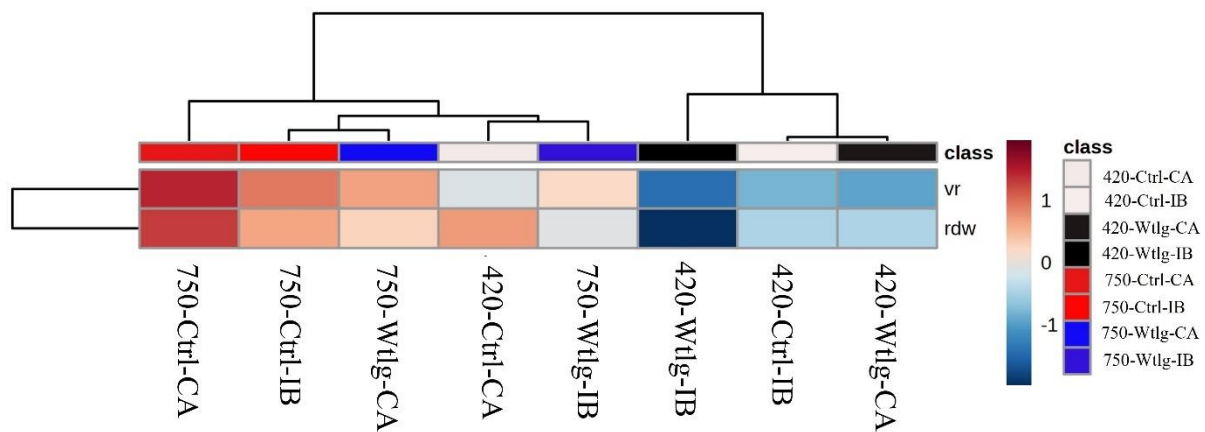


Figure 13. Heatmap of root system volume (RV) and root dry weight (RDW) in flooding-sensitive 446 soybean plants (PELBR15–7060) cultivated under different CO_2 concentrations ($a[\text{CO}_2]$ or elevated 447 $[\text{CO}_2]$, $e[\text{CO}_2]$) with different symbiotic associations and subjected to flooding (7 days) followed by 448 drainage (4 days). I: *Bradyrhizobium* inoculation; CA: co-inoculation with *Azospirillum brasilense* + 449 *Bradyrhizobium*. Blue-to-red color gradients ($\log_{10}$ scale) indicate increases and decreases, 450 respectively. White: $a[\text{CO}_2]$ control plants; black: $a[\text{CO}_2]$ flooded plants; red: $e[\text{CO}_2]$ control plants; 451 blue: $e[\text{CO}_2]$ flooded plants.

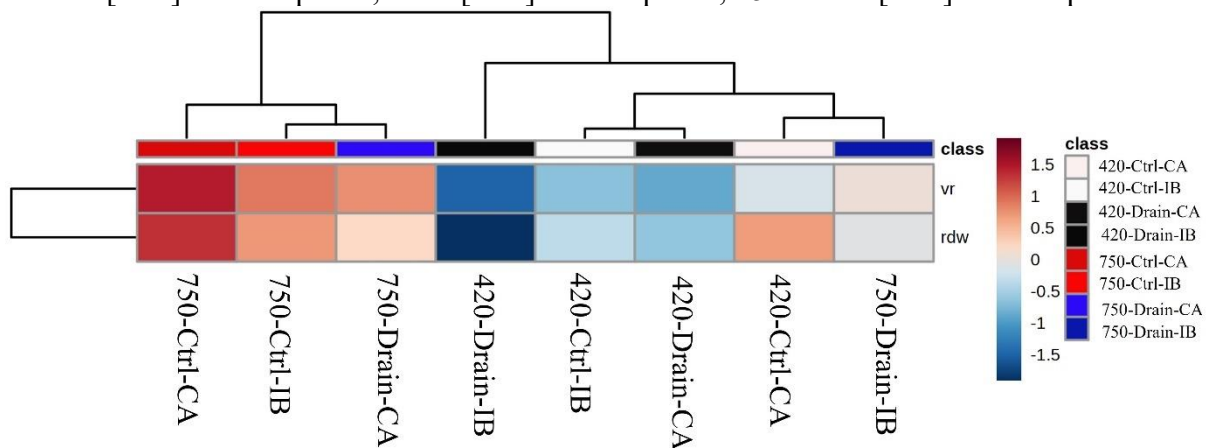


Figure 14. Heatmap of root volume (RV) and root dry weight (RDW) in waterlogging-sensitive soybean plants (cultivar PELBR15–7060) grown under ambient ($a[\text{CO}_2]$) or elevated ($e[\text{CO}_2]$) CO_2 concentrations, with different symbiotic associations, and subjected to waterlogging for seven days followed by a four-day reoxygenation (drainage) period. IB: inoculation with *Bradyrhizobium*; CA: co-inoculation with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*. Blue-to-red color gradients ($\log_{10}$ scale) represent relative increases and decreases, respectively. Color codes: white = $a[\text{CO}_2]$ control; black = $a[\text{CO}_2]$ reoxygenated; red = $e[\text{CO}_2]$ control; blue = $e[\text{CO}_2]$ reoxygenated.

4. DISCUSSION

Some soybean genotypes possess physiological and anatomical adaptations that enable tolerance to short-term waterlogging (Borella et al., 2017; Garcia et al., 2020; Posso et al., 2025). However, soybean is generally considered waterlogging-sensitive, and prolonged stress can lead to severe physiological damage or mortality depending on genotype and duration (Garcia et al., 2020). The genotype used in this study is classified as waterlogging-sensitive by the EMBRAPA breeding program, based on reduced biomass accumulation, lower photosynthetic capacity, and increased susceptibility to hypoxia-related stress, as previously demonstrated by our group (Garcia et al., 2020; Posso et al., 2025). Given this sensitivity, we hypothesized that co-inoculation of *Bradyrhizobium* with *Azospirillum*, through its influence on nitrogen (N) metabolism and hormonal signaling, could confer adaptive advantages under stress conditions and promote a degree of waterlogging tolerance.

During waterlogging, the inhibition of the respiratory electron transport chain and activation of fermentative metabolism in roots (Voesenek et al., 2013; van Dongen et al., 2015; Posso et al., 2025) lead to cytosolic acidosis, which reduces aquaporin activity, limits water uptake, and impairs gaseous exchange—resulting in lower A , g_s , and C_i (Maurel et al., 2015; Shimoia et al., 2024; Zhang et al., 2024; 2025; Posso et al., 2025).

The experiment was conducted under high temperatures ($\sim 30^\circ\text{C}$), which not only reflect common field conditions but also markedly intensify photorespiration by increasing the oxygenation activity of Rubisco (Long, 1991). Under these thermal regimes, CO_2 assimilation (A) becomes even more dependent on stomatal conductance (g_s), since g_s simultaneously regulates transpiration (E) and CO_2 diffusion into the leaf (Li et al., 2010; Zhu et al., 2022; Qui et al., 2025). Ordinarily, plants maintain a balance between A and E to optimize photosynthesis and cooling; however, when waterlogging occurs, root hypoxia restricts stomatal opening, causing g_s —and thus both E and CO_2 uptake—to decline. The combination of elevated photorespiration at $\sim 30^\circ\text{C}$ and impaired gas exchange under waterlogging creates a dual constraint on carbon assimilation, exacerbating reductions in net photosynthesis and, ultimately, yield—particularly in genotypes sensitive to hypoxic stress (Githiri et al., 2006; Kaur et al., 2020; Posso et al., 2023; Shimoia et al., 2024; Posso et al., 2025).

Our results show reductions in A , g_s , and C_i during waterlogging, coinciding with increases in GO activity—a hallmark of enhanced photorespiration (Yin et al., 2016; Posso et al., 2018; Lothier et al., 2020). GO, as a peroxisomal enzyme, catalyzes the conversion of

glycolate to glyoxylate and is linked to waterlogging tolerance mechanisms, besides releasing H_2O_2 (Mustafa et al., 2023). The GS-GOGAT cycle, in parallel, functions primarily in N assimilation, converting ammonium into glutamine and glutamate (Ferrario-Mery et al., 2002; Wang et al., 2016). These pathways, though interconnected through glyoxylate metabolism, respond differently to waterlogging. For instance, leaf GS activity declined after 10 days of waterlogging, possibly due to N deficiency, as N_2 fixation is rapidly inhibited under hypoxia, despite photorespiration generating ammonia (Da-Silva et al., 2021; do-Amarante et al., 2022; Bauwe, 2023). The suppression of GS may also reflect decreased Mn and Mg availability, both essential cofactors under stress (Board et al., 2008).

Despite these limitations, the GS-GOGAT cycle is fundamental to maintaining N assimilation and buffering metabolic imbalance. Soybeans are known to remobilize N and carbon compounds between organs during stress. This metabolic buffering is often conceptualized as a "snorkel" (Victor et al., 2018; Posso et al., 2025), a metaphor describing the bidirectional transport of key metabolites: glutamate and aspartate from shoots to roots, and malate and succinate from roots to shoots. This metabolic exchange alleviates stress by ensuring energetic support for both organs. Our data suggest that this snorkel-like mechanism may have been sustained by GS-GOGAT activity, particularly in co-inoculated plants and those under $e[\text{CO}_2]$. It should be clarified that while the term "snorkel" is metaphorical, our inference is supported by physiological indicators and enzymatic patterns observed in this study, in line with prior metabolite-based analyses (Victor et al., 2018).

Plants grown under $e[\text{CO}_2]$ maintained higher A despite lower g_s , likely due to increased C_i and suppression of photorespiration (AbdElgawad et al., 2022). This is consistent with previous reports indicating that $e[\text{CO}_2]$ promotes stomatal closure, reducing E and improving water-use efficiency (Ainsworth et al., 2007), which may mitigate waterlogging damage. GO activity was drastically lower in $e[\text{CO}_2]$ plants, supporting the hypothesis of reduced photorespiration. Although GS-GOGAT activity also decreased under $e[\text{CO}_2]$, the decline in GO was proportionally greater, suggesting a metabolic shift favoring N assimilation over photorespiration. This shift may explain the improved N_2 fixation (Li et al., 2017) and N metabolism observed in cotton and other legumes under elevated CO_2 (Guilherme et al., 2019).

Interestingly, CA treatment alone also alleviated stress. Under $a[\text{CO}_2]$, CA plants showed higher GS-GOGAT activity than IB plants, suggesting that co-inoculation may compensate for photorespiration-induced N demands. Under $e[\text{CO}_2]$, differences in N metabolism between CA and IB were maintained, likely reflecting more efficient symbiotic

performance. Co-inoculation may enhance the metabolic snorkel (Victor et al., 2018; Posso et al., 2025) by improving sugar supply to the rhizosphere and sustaining N₂ fixation (Aranjuelo et al., 2014), especially under elevated CO₂.

Azospirillum is known to modulate plant hormonal pathways, notably through ACC deaminase activity, which degrades the ethylene precursor ACC into ammonia and α -ketobutyrate (Li et al., 2005; Glick, 2014; Chieb et al., 2023), two key molecules involved in the GS/GOGAT cycle during nitrogen assimilation (McDonnell et al. 2009). Reduced ethylene levels inhibit fermentation and promote aerobic metabolism (Cassán et al., 2014; Pons et al., 2020). Improved aquaporin function (Zawoznik et al., 2011) and the facilitated transport of ACC from root to shoot (Grichko et al., 2001) may also explain the better gas exchange and nutrient balance in CA plants. Although hormonal pathways were not directly measured in our study, indirect evidence, such as improved GS activity and biomass accumulation, supports this mode of action under both CO₂ regimes.

The enhancements observed in SDW and RDW are likely outcomes of these integrated mechanisms. As a C₃ species, soybean shows a strong positive biomass response to e[CO₂], particularly up to 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Drag et al., 2020). Structural advantages before stress onset may increase waterlogging tolerance. For instance, increased stem diameter may reflect aerenchyma formation, a well-known adaptation that improves internal oxygen transport (Thomas et al., 2005; Yamauchi et al., 2018; Fukao et al., 2019). Aerenchyma may also occur in nodules, maintaining *Bradyrhizobium* viability under hypoxic conditions and enhancing CA effectiveness.

CA plants under e[CO₂] had the highest root volume, a likely result of improved A and photoassimilate partitioning (Drag et al., 2020), along with *Azospirillum*-induced growth promotion (Shimoia et al., 2023). Co-inoculation also enhances hormonal regulation (Cassán et al., 2014; Fukami et al., 2018), micronutrient uptake (Etesami et al., 2020), and potentially Mn/Mg availability, supporting sustained GS activity (Board et al., 2008).

Lastly, these findings emphasize the continued relevance of inoculation in soybean cultivation. Without *Bradyrhizobium*, soybean becomes N-deficient. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) like *Azospirillum* enhance root growth and resilience. Our results show that under e[CO₂], bacterial performance remains robust. However, diazotrophs adapted to elevated CO₂ may underperform under current ambient conditions (Soba et al., 2021), reinforcing the need for CO₂-specific screening and development of microbial inoculants. These adaptations will be crucial in waterlogging-prone regions where climate change is expected to intensify waterlogging stress.

5. CONCLUSION

This study demonstrates that soybean plants grown under elevated CO₂ (e[CO₂]) and co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* exhibit improved tolerance to waterlogging, as evidenced by higher photosynthetic rates, reduced photorespiration, and enhanced nitrogen metabolism, factors that collectively support greater shoot and root biomass accumulation. Notably, the physiological responses of non-co-inoculated plants under e[CO₂] mirrored those of co-inoculated plants under ambient CO₂, underscoring the importance of microbial interactions in stress mitigation.

These findings highlight the critical role of *Bradyrhizobium* in nitrogen supply, particularly under elevated biomass demands. Co-inoculation with *Azospirillum* presents a promising strategy to enhance waterlogging tolerance in soybean, especially when combined with elevated CO₂ conditions. However, this potential must be further validated under field-scale and long-term scenarios.

Given projected increases in atmospheric CO₂ concentrations and the frequency of extreme rainfall events that intensify waterlogging, microbial co-inoculation may become an increasingly valuable agronomic tool for improving soybean resilience—even in genotypes classified as waterlogging-sensitive. Such strategies offer a proactive avenue for adapting crop management to future climate challenges.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Author contributions

Conceptualization, E.P.S., D.A.P., C.J.d.-S. and L.d.A.; methodology, E.P.S.; validation, E.P.S.; formal analysis, E.P.S., D.A.P., A.U.B., J.B., N.D.C.B. and I.R.C.; investigation, E.P.S., D.A.P. and N.D.C.B.; resources, A.C.B.d.O., L.A.d.A. and L.d.A.; data curation, E.P.S. and I.R.C.; writing—original draft preparation, E.P.S.; writing—review and editing, E.P.S., D.A.P. and J.B.; visualization, E.P.S.; supervision, D.A.P., C.J.d.-S. and L.d.A.; project administration, L.d.A.; funding acquisition, L.d.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

6. REFERENCES

- AbdElgawad, H., Ahmed, M., Mohammed, A. E., Alotaibi, M. O., Yehia, R. S., Selim, S., ... & Sheteiwy, M. S. (2022). Increasing atmospheric CO₂ differentially supports arsenite stress mitigating impact of arbuscular mycorrhizal fungi in wheat and soybean plants. *Chemosphere*, 296, 134044. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134044>
- Ainsworth, E. A., & Rogers, A. (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, cell & environment*, 30(3), 258-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x>
- Aranjuelo, I., Arrese-Igor, C., & Molero, G. (2014). Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of plant physiology*, 171(12), 1076-1090. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.002>
- Bai Y., R, Yang P., Su Y., Y, He Z., L, Ti X., N (2014) Effect of exogenous methanol on glycolate oxidase and photorespiratory intermediates in cotton. *J Exp Bot* 65:5331–5338. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru294>
- Bauwe, H. (2023). Photorespiration–Rubisco's repair crew. *Journal of Plant Physiology*, 280, 153899. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153899>
- Board, J. E. (2008). Waterlogging effects on plant nutrient concentrations in soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 31(5), 828-838. <https://doi.org/10.1080/01904160802043122>
- Borella, J., Oliveira, H. C., de Oliveira, D. D. S. C., Braga, E. J. B., de Oliveira, A. C. B., Sodek, L., & do Amarante, L. (2017). Hypoxia-driven changes in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolites of two nodulated soybean genotypes. *Environmental and experimental botany*, 133, 118-127.
- Cassán, F., Vanderleyden, J. & Spaepen, S. (2014). Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33, 440–459 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362->
- Chieb, M., Gachomo, EW The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses (2023). *BMC Plant Biol* 2 , 407. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>
- Cullimore, J.V.;Lara, M.; Lea, P.J.; Mifflin, B.J. (1982). Multiple forms of glutamine synthetase in plant fraction of Phaseolus root nodules. *Israel Journal Botany*. 31: 155-162.

- Da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020). Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104242.
- Da-Silva, C. J., Shimoia, E. P., Posso, D. A., Cardoso, A. A., Batz, T. A., Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2021). Nitrate nutrition increases foliar levels of nitric oxide and waterlogging tolerance in soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03291-5>
- do Amarante, L., Lima, J. D., & Sodek, L. (2022). Alterations of xylem transport of key metabolic products of assimilatory activity in soybean: do similar alterations occur in roots and nodules? *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(1), 11.
- Drag D., W, Slattery R., Matthew E., H., L., Ort D., R., Bernacchi C., J., (2020) Soybean photosynthetic and biomass responses to carbon dioxide concentrations ranging from pre-industrial to the distant future, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 12, 22 June, Pages 3690–3700, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa133>
- Etesami, H., & Adl, S. M. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. *Phyto-Microbiome in stress regulation*, 147-203. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_9
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). *Stages of soybean development*. Iowa State University, Special Report 80, Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA, USA. 11 p.
- Ferrario-Mery, S., Hodges, M., Hirel, B., & Foyer, C. H. (2002). Photorespiration-dependent increases in phospho enol pyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta*, 214, 877-886. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0692-2>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *Amb Express*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00340>

- Garcia, N., da-Silva, C. J., Cocco, K. L. T., Pomagualli, D., de Oliveira, F. K., da Silva, J. V. & do Amarante, L. (2020). Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through 620 different physiological and biochemical mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 172, 103975. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.103975>
- Githiri, S. M., Watanabe, S., Harada, K., & Takahashi, R. (2006). QTL analysis of waterlogging tolerance in soybean at an early vegetative growth stage. *Plant Breeding*, 125(6), 613-618. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01291.x>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S09819428\(00\)01213-4](https://doi.org/10.1016/S09819428(00)01213-4)
- Guilherme, E. A., Carvalho, F. E. L., Daloso, D. M., & Silveira, J. A. G. (2019). Increase in assimilatory nitrate reduction and photorespiration enhances CO₂ assimilation under high light-induced photoinhibition in cotton. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.012>
- Heino, M., Kinnunen, P., Anderson, W., Ray, D. K., Puma, M. J., Varis, O., & Kumm, M. (2023). Increased probability of hot and dry weather extremes during the growing season threatens global crop yields. *Scientific Reports*, 13(1), 3583. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29378-2>
- Juge, C., Prévost, D., Bertrand, A., Bipfubusa, M., & Chalifour, F. P. (2012). Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Applied Soil Ecology*, 61, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.05.006>
- Kaur, G., Singh, G., Motavalli, P. P., Nelson, K. A., Orlowski, J. M., & Golden, B. R. (2020). Impacts and management strategies for crop production in waterlogged or waterlogged soils: A review. *Agronomy Journal*, 112(3), 1475-1501. <https://doi.org/10.1002/agj2.20093>
- Klamt, E., Kämpf, N., & Schneider, P. (1985). Lowland soils of the State of Rio Grande do Sul (Soil Technical Bulletin, No. 4, 43 p.). Porto Alegre: Department of Soils, UFRGS (In portuguese).
- Li, C. X., Wei, H., Geng, Y. H., & Schneider, R. (2010). Effects of submergence on

photosynthesis and growth of *Pterocarya stenoptera* (Chinese wingnut) seedlings in the recently-created Three Gorges Reservoir region of China. *Wetlands ecology and management*, 18, 485-494. <https://doi.org/10.1007/s11273-010-9181-3>

Li, Q., Saleh-Lakha, S., & Glick, B. R. (2005). The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Canadian journal of microbiology*, 51(6), 511-514. <https://doi.org/10.1139/w05-027>

Li, Y., Yu, Z., Liu, X., Mathesius, U., Wang, G., Tang, C., & Jin, J. (2017). Elevated CO₂ increases nitrogen fixation at the reproductive phase contributing to various yield responses of soybean cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1546. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01546>

Long S., P. Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: has its importance been underestimated?. (1991) *Plant, Cell & Environment*. Oct;14(8):729-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01439.x>

Lothier, J., Diab, H., Cukier, C., Limami, A. M., & Tcherkez, G. (2020). Metabolic responses to waterlogging differ between roots and shoots and reflect phloem transport alteration in *Medicago truncatula*. *Plants*, 9(10), 1373. <https://doi.org/10.3390/plants9101373>

Matoh T., Takahashi E., Ida S., (1979). Glutamate synthase in developing pea cotyledons: Occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes, *Plant and Cell Physiology*, Volume 20, Issue 7, November, Pages 1455–1459, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075947>

Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D. T., Santoni, V., Shahzad, Z., & Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiological reviews*, 95(4), 1321-1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>

McDonnell, L., Plett, J. M., Andersson-Gunnerås, S., Kozela, C., Dugardeyn, J., Van Der Straeten, D., Glick, B., R., Sundberg B., & Regan, S. (2009). Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiologia Plantarum*, 136(1), 94-109. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01208.x>

Mustafa, G., & Komatsu, S. (2023). Proteomics: Aim at Stress Mitigation in Soybean under Waterlogging. *Climate Change and Legumes: Stress Mitigation for Sustainability and Food Security*. <https://doi/10.1201/9781003214885-5>

Mustroph, A. & Albrecht, G. (2003). Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and

anoxia. *Physiologia Plantarum*, 117(4), 508–520. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00051.x>

Oliveira, I. C., Brears, T., Knight, T. J., Clark, A., & Coruzzi, G. M. (2002). Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiology*, 129(3), 1170-1180. <https://doi.org/10.1104/pp.020013>

Pons, S., Fournier, S., Chervin, C., Bécard, G., Rochange, S., Frei Dit Frey, N., & Puech Pagès, V. (2020). Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *PLoS One*, 15(10), e0240886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886>

Posso, D. A., da-Silva, C. J., Shimoia, E. P., da Silva Martins, T., Reissig, G. N., de Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Root-hypoxia tolerance in soybean sister-lines plants indicates a better balance in energy use/dissipation and oxidative stress control. *Plant Stress*, 10, 100225.

Posso, D. A., Shimoia, E. P., da-Silva, C. J., Phan, A. N. T., Reissig, G. N., da Silva Martins, T., & do Amarante, L. (2025). Soybean tolerance to waterlogging is achieved by detoxifying root lactate via lactate dehydrogenase in leaves and metabolizing malate and succinate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 220, 109520. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109520>

Posso, D.A., Borella, J., Reissig, G.N., Bacarin, M.A., (2018). Root flooding-induced changes in the dynamic dissipation of the photosynthetic energy of common bean plants. *Acta Physiol. Plant.* 40, 212. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2790-9>.

Qiu, S., Zhang, Y., Sun, H., Liu, L., Li, C., Hua, Z. Q., & Dong, H. (2025). Integrated transcriptomics and metabolomics elucidate additive inhibitory effects of combined salinity-waterlogging stress on soybean growth and metabolic adaptations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 223, 109847. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109847>

Rogers, A., Ainsworth, E. A., & Leakey, A. D. (2009). Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes?. *Plant Physiology*, 151(3), 1009-1016. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144113>

Rogers, A., Ainsworth, E. A., & Leakey, A. D. (2009). Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes?. *Plant Physiology*, 151(3), 1009-1016. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144113>

Shimoia, E. P., Da-Silva, C. J., Posso, D. A., da Silva Martins, T., Agualongo, D. A. P., de

- Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Co-inoculation of seeds with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and *Rhizophagus* improves nitrogen assimilation and growth in soybean plants subjected to waterlogging. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 146. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601040>
- Shimoia, E. P., Posso, D. A., da-Silva, C. J., Bester, A. U., Bernardi, N. D. C., Carvalho, I. R., & do Amarante, L. (2024). Co-Inoculation of Soybean Seeds with *Azospirillum* and/or *Rhizophagus* Mitigates the Deleterious Effects of Waterlogging in Plants under Enhanced CO₂ Concentrations. *Nitrogen*, 5(4), 941-976. <https://doi.org/10.3390/nitrogen5040061>
- Soba, D., Aranjuelo, I., Gakière, B., Gilard, F., Pérez-López, U., Mena-Petite, A., ... & Sanz-Saez, A. (2021). Soybean inoculated with one bradyrhizobium strain isolated at elevated [CO₂] show an impaired c and n metabolism when grown at ambient [CO₂]. *Frontiers in Plant Science*, 12, 656961. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656961>
- Thomas, A. L., Guerreiro, S. M. C., & Sodek, L. (2005). Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the waterlogged root system of nodulated soybean. *Annals of Botany*, 96(7), 1191-1198. <https://doi.org/10.1093/aob/mci272>
- van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 345-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114813>
- Vitor, S. C., & Sodek, L. (2019). Products of anaerobic metabolism in waterlogged roots of soybean are exported in the xylem. *Plant science*, 284, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.023>
- Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. (2013). Ethylene-and oxygen signalling-drive plant survival during waterlogging. *Plant Biology*, 15(3), 426-435. <https://doi.org/10.1111/plb.12014>
- Wang, X., Huang, M., Zhou, Q., Cai, J., Dai, T., Cao, W., & Jiang, D. (2016). Mecanismos fisiológicos e proteômicos de priming de alagamento melhoram a tolerância ao estresse de alagamento no trigo (*Triticum aestivum* L.). *Botânica Ambiental e Experimental*, 132, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.003>
- Yamauchi, T., Colmer, T. D., Pedersen, O., & Nakazono, M. (2018). Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-waterlogging stress. *Plant physiology*, 176(2), 1118-1130. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01157>
- Yin, X., Nishimura, M., Hajika, M., & Komatsu, S. (2016). Quantitative proteomics reveals

- the waterlogging-tolerance mechanism in mutant and abscisic acid-treated soybean. *Journal of Proteome Research*, 15(6), 2008-2025. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00196>
- Zanon, A. J., Silva, M. R. da, Tagliapietra, E. L., Cera, J. C., Bexaira, K. P., Richter, G. L., Duarte Júnior, A. J., Marques da Rocha, T. S., Weber, O. S., & Streck, N. A. (2018). *Ecofisiologia de soja: visando altas produtividades* (136 p.). Santa Maria: Pallotti Gráfica.
- Zawoznik, M.S., Ameneiros, M., Benavides, M.P. (2011) Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1389–1397. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3162-1>
- Zhang, Y., Liang, T., & Dong, H. (2024). Melatonin enhances waterlogging tolerance of field-grown cotton through quiescence adaptation and compensatory growth strategies. *Field Crops Research*, 306, 109217. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2023.109217>
- Zhang, Y., Qiu, S., Liang, T., Xu, S., et al. (2025). Mitigating waterlogging-induced yield loss in cotton through removal of early fruits: Agronomic and physiological mechanisms. *Field Crops Research*, 331, 109996. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2025.109996>
- Zhu, Y., Cheng, Z., Feng, K., Chen, Z., Cao, C., Huang, J., & Gao, Y. (2022). Influencing factors for transpiration rate: A numerical simulation of an individual leaf system, 27, 101110. <https://doi.org/10.1016/j.tsep.2021.101110>

CAPÍTULO III - Impacto da coinoculação foliar de *Azospirillum* em plantas de soja associadas simbioticamente com *Bradyrhizobium* submetidas à condição de alagamento

RESUMO

As mudanças climáticas extremas têm provocado, em uma mesma safra, a ocorrência de períodos alternados de seca e alagamento com intensidade crescente. Esses eventos causam distúrbios no metabolismo vegetal, resultando em queda da produtividade e, em casos mais severos, levando à senescência e até à morte das plantas. A coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* tem se mostrado eficaz na promoção de melhorias nos metabolismos do carbono e do nitrogênio. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da coinoculação via parte aérea com *Azospirillum* em plantas de soja submetidas ao alagamento. Foram comparados três tratamentos: inoculação apenas com *Bradyrhizobium* (Brad); coinoculação via sementes com *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* (Brad+AzosR); e coinoculação via parte aérea com pulverização foliar de *Azospirillum*, associada à inoculação via sementes com *Bradyrhizobium* (Brad+AzosF). As plantas, no estágio V4 (quatro folhas trifolioladas), foram submetidas ao alagamento por sete dias, seguido de um período de drenagem de quatro dias. Amostras de folhas e raízes foram coletadas aos quatro e sete dias para análises metabólicas e biométricas. As plantas coinoculadas apresentaram maiores taxas de trocas gasosas (g_s , E , C_i), resultando em maior assimilação de carbono (A), mesmo sob alagamento. Além disso, observaram-se reduções na atividade da enzima glicolato oxidase (GO) e do sistema GS-GOGAT nas folhas, especialmente nos tratamentos com coinoculação via parte aérea. Plantas coinoculadas também apresentaram menores concentrações de H_2O_2 em folhas e raízes, aliadas a maior atividade do sistema antioxidante, o que se refletiu em menor acúmulo de (MDA). Houve ainda maior atividade das enzimas fermentativas (LDH, PDC, ADH, Ala-AT), melhor dinâmica de metabólitos nitrogenados (AAs, ureídeos) e maior acúmulo de biomassa. Em conjunto, os resultados indicam que a coinoculação com *Azospirillum* via parte aérea contribui de forma mais significativa para mitigar os efeitos negativos do alagamento em plantas de soja, possivelmente devido à permanência do microrganismo em um compartimento não sujeito à hipóxia.

Palavras-chave: Hipóxia, coinoculação foliar, *Glycine max*, *Azospirillum*, fotorrespiração.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas devido ao aquecimento global resultam em alterações na dinâmica das precipitações, com intensificação nos volumes pluviométricos causando alagamentos, o que pode ser facilitado pelas características edáficas das regiões afetadas. Em regiões de terras baixas, onde o cultivo da soja tem aumentado em substituição à cultura do arroz irrigado (Ribas et al., 2021), o solo normalmente possui má drenagem, topografia plana, lençol freático elevado e geralmente é caracterizado por um horizonte B textural, o qual garante ao perfil do solo uma baixa capacidade de infiltração de água (Collaku e Harrison, 2002; Jitsuyama, 2017).

O grande problema imposto pelo alagamento tanto em soja quanto em outras culturas é a redução dos níveis de oxigênio (O_2) no solo e nas raízes das plantas. O O_2 é exigido pelas células para realizar o processo respiratório, desempenhando papel fundamental comoceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (CE) (Arminstrong e Strange, 1994; Antônio et al., 2016). A redução dos níveis de O_2 desencadeia alterações fisiológicas afetando a homeostase metabólica, caracterizando o estresse por déficit de O_2 (Ploschuk et al., 2019). Dentre essas alterações estão a ativação do metabolismo fermentativo, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade de enzimas antioxidantes, reduções nas trocas gasosas foliares, deficiências nutricionais, principalmente de nitrogênio (Amarante et al., 2022; da-Silva 2022). A interação entre raízes e parte aérea para remobilizar N, estruturas carbônicas e regenerar poder redutor entre os órgãos é de suma importância, sendo realizada através da plena atividade das enzimas do sistema glutamina sintetase e glutamato sintase (GS-GOGAT). (Vitor et al., 2019). O sistema GS-GOGAT, também é responsável por atender a demanda da fotorrespiração, consumindo a amônia gerada (Marino et al., 2022). Como o sistema GS-GOGAT tem sua atividade severamente reduzida durante o alagamento, o mecanismo deve ser útil até certo ponto durante o período de alagamento e bastante utilizado na reoxigenação para auxiliar a retomada do metabolismo (Vitor et al., 2019).

O processo de fixação de N_2 por *Bradyrhizobium* é afetado negativamente por fatores ambientais estressantes como altas temperaturas, salinidade, déficit hídrico, alagamento dentre outros fatores (Aranjuelo et al., 2014). Durante o alagamento, devido à baixa difusão dos gases O_2 e N_2 em água, diminui a disponibilidade tanto do O_2 quanto do N_2 e assim, a fixação de N_2 fica prejudicada. Isso ocorre por falta de energia advinda da respiração celular promovida pelo O_2 e por falta de substrato para a enzima nitrogenase parando a fixação de N_2 (Justino e Sodek et al., 2013; Amarante et al., 2022). A utilização de cultivares mais tolerantes ao alagamento, e aplicações de nitrato são formas de melhorar o desempenho de plantas de soja frente ao alagamento (Posso et al., 2025; da-silva e Amarante 2020). A técnica de coinoculação da soja com *Azospirillum* também tem melhorado a eficiência do processo de fixação de N_2 desempenhado por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Barbosa et al., 2021).

As bactérias do gênero *Azospirillum* além de fixar o N_2 (Day e Döbereiner 1976), são capazes de produzir de fitohormônios como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, promovendo o crescimento das plantas (Reynders e Valssak 1979; Tien et al., 1979; Cassán et al., 2014; Khan et al., 2020). Plantas coinoculadas com *Azospirillum* conseguem resistir melhor a estresses bióticos e abióticos (Fulkami et al., 2018a). As melhores respostas das

plantas aos estresses após a associação com *Azospirillum*, deve-se a sua capacidade de melhorar a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (CAT, SOD e APX) e produção de óxido nítrico (NO) (Fulkami et al., 2018; Creus et al., 2005). O NO, independentemente de sua fonte, pode atuar tanto na detoxificação de espécies reativas de oxigênio quanto em melhores respostas do metabolismo fermentativo durante estresse por alagamento (da-Silva e do Amarante, 2020). Shimoia et al. (2023), descreveram efeitos benéficos, como plantas com maior área foliar, maior concentração de aminoácidos e maior atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo nitrogenado em raízes e nódulos da coinoculação de plantas de soja com *Azospirillum*, mesmo em condições de alagamento. O *Azospirillum* também é capaz de melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas, dentre eles, N, P, K, S, Fe e Mg e uma das razões das plantas melhorarem a absorção destes nutrientes é o aumento do sistema radicular proporcionado pela ação da bactéria (Etesami et al., 2020).

A inoculação das sementes é o método mais comum de aplicação de (Plant Growth-Promoting Bacteria) PGPB, mas a pulverização foliar ou no sulco também são opções, que permitem que as bactérias interajam com a planta (Bashan et al., 2014; Ramirez-Odorica et al., 2020). Quando o *Azospirillum* é aplicado via parte aérea sua maior aderência é detectada na superfície abaxial das folhas e dentro de 48 horas não são mais detectadas bactérias na parte adaxial, devido à procura do local ideal para associação, ambiente microaeróbico (Puente et al., 2021). Em ambos os limbos foliares seu acúmulo foi detectado próximo as nervuras das folhas, no espaço entre células, ao redor dos estômatos e internamente a bactéria foi detectada nos vasos do xilema, colonizando os espaços intracelulares abaixo da epiderme das folhas, locais em que as trocas metabólicas entre microrganismo e planta ocorrem de forma similar ao que acontece quando a associação ocorre em raízes (Gilbert et al., 2022). Em raízes também foi identificado tanto no espaço intracelular abaixo da epiderme quanto formando biofilme ao redor das raízes (Ramirez-Mata et al., 2018). Os resultados confirmaram a promoção do crescimento da soja, aumentando comprimento total da planta e da raiz, peso seco da parte aérea e da raiz, número de nódulos na raiz primária, aumento da simbiose com *B. japonicum* e peso de nódulo após a coinoculação foliar com *Azospirillum* (Puente et al., 2018). A coinoculação foliar promoveu efeitos positivos no crescimento do milho (Portugal et al. 2016), melhorou a nodulação na soja (Puente et al. 2019) e aumentou a biomassa, nitrogênio acumulado, o peso de mil grãos e a produtividade de grãos em feijão (Filipini et al., 2021).

A interação das plantas com inúmeros microrganismos presentes no solo é inevitável, seja ela benéfica ou não. Sendo assim, é importante investigarmos como elas funcionam e utilizar de ferramentas para promover o aumento de associações ou simbioses que beneficiem as culturas. Nossa hipótese é de que com a coinoculação do *Azospirillum* via parte aérea, a permanência da bactéria em um meio oxigenado possibilite ao microrganismo melhores condições de mitigar os efeitos deletérios do alagamento, promovendo uma maior interação de troca metabólica com a planta. Nosso objetivo foi avaliar, sob condições de alagamento, se as enzimas chaves do processo fermentativo, fotorrespiratório e nitrogenado, são alteradas em plantas de soja cultivadas sob os tratamentos de coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* via sementes ou parte aérea.

2. METODOLOGIA

2.1 Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos

Sementes de soja cedidas pelo programa de melhoramento da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) da cultivar PEL BR 157060, sensível ao alagamento, foram esterilizadas com etanol 80% por dois minutos e hipoclorito de sódio 10% (p/v) por dois minutos e lavadas durante cinco minutos com água esterilizada. Subsequentemente, as sementes foram tratadas com os microrganismos na seguinte ordem: 1) Brad: Sementes inoculadas somente com *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium elkanii*; SEMIA 5019 e *Bradyrhizobium japonicum*; SEMIA 5079). 2) Brad+AzosR: Sementes inoculadas com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* (cepas Ab-V5 e Ab-V6). 3) Brad+AzosF: Sementes inoculadas com *Bradyrhizobium* e com *Azospirillum* aplicado via foliar, conforme (Figura 1).

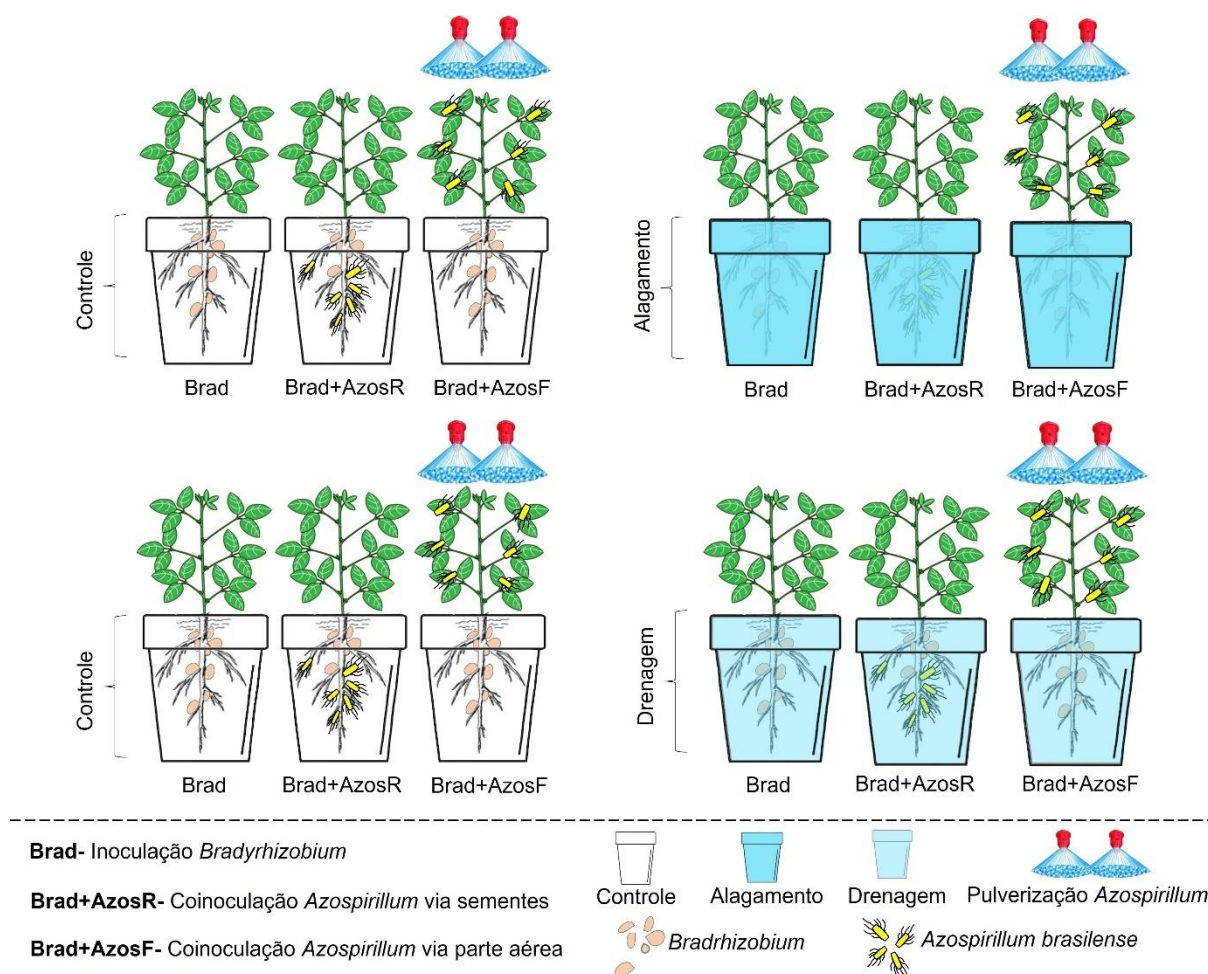


Figura 1. Esquema representativo dos tratamentos e desenho experimental. Plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior recuperação (quatro dias) Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* *brasilense* via sementes; Brad+AzosF- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* *brasilense* via parte aérea.

As bactérias foram inoculadas em laboratório nas sementes utilizando as seguintes doses e sequência: *Bradyrhizobium* (cepas 5019 e 5079) na proporção de 4 mL Kg⁻¹ de sementes com garantia de 5 X 10⁹ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL⁻¹ e *Azospirillum* *brasilense* (cepas Ab-v5 e Ab-v6) na proporção de 2 mL Kg⁻¹ de sementes com garantia de 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹. Após 60 minutos de tratamento, foi realizada a semeadura de cinco sementes por vaso com capacidade de três litros, preenchido com solo típico de regiões de várzea (local de coleta do solo: 31°48'26.21"S; 52°28'48.20"W), esterilizado em autoclave (127°C; 1,5 ATM; 1h e 30 min) e corrigido o pH, utilizando calcário com PRNT de 70%, para atender a demanda nutricional de altas produtividades da cultura da soja, conforme Manual de Adubação e Calagem (2016). As características químicas do solo estão descritas na Tabela 1. Na aplicação aérea foram utilizados 250 mL ha⁻¹ com 2 x 10⁹ UFC mL⁻¹, volume de calda de 150 L ha⁻¹. A aplicação foi realizada quando a planta apresentava 3 folhas completamente expandidas (V3), com um pulverizador costal pressurizado a CO₂ munido com barra de 2,0

metros de comprimento, contendo quatro pontas de pulverização XR11001. A aplicação foi realizada entre 18:00 e 18:30 horário de Brasília e os vasos foram cobertos para que o produto não atingisse diretamente o solo, deixando somente a parte aérea das plantas expostas ao produto.

Tabela 1: Características químicas do solo utilizado no experimento.

pH água	Textura	CTC efetiva	Saturação Bases (%)	Índice SMP	CTC pH 7
6,79	3	8,3	88,7	7,26	9,3
P-Mehlich	K	Cu	Zn	Mn	S
mg/dm ³					
7,9	98,8	1,1	1,1	3,5	12,1
K	Ca	Mg	H + Al	Al	Relação Ca/Mg
cmolc/dm ³					
0,253	4,7	3,3	1	0	1,4
Relações Molares				%MO	%Argila
K/CTC	Ca/CTC	Mg/CTC	(Ca + Mg)/ K	m/v	
2,72	50,5	35,5	31,6	1,5	22

Após a emergência e a abertura do par de folhas unifolioladas, foi realizado um raleio mantendo-se duas plantas por vaso. Quando as plantas atingiram estágio fenológico V4, um estágio após a inoculação via foliar (momento em que a planta apresenta cinco nós e quatro trifólios) (Fehr 1977) foram submetidas ao alagamento por sete dias e posterior drenagem por quatro dias. Para imposição do tratamento de alagamento as quatro repetições de cada tratamento foram colocadas dentro de um recipiente maior, sem furos, possibilitando manter uma lâmina de água acima do solo de aproximadamente sete centímetros. Para a drenagem, os vasos foram retirados destes recipientes e deixados para drenar naturalmente. Foram realizadas duas coletas de dados, uma ao final do período de alagamento e outra ao final do período de drenagem. Análises biométricas foram feitas nos dias de cada coleta e o material para análises bioquímicas foi coletado e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

2.2 Trocas gasosas, crescimento das plantas, acúmulo de biomassa e conteúdo total de clorofila

As trocas gasosas foram medidas em folhas jovens intactas (primeira folha trifoliada totalmente expandida) com um analisador portátil de CO₂ por infravermelho (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA), ao fim do período de alagamento bem como ao fim do período de drenagem. As medidas foram feitas entre 8 e 10 h, com monitor de CO₂ na câmara de concentração de 400 µmol mol⁻¹ e uma densidade de fluxo de fótons de 1250 µmol

fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, usando a fonte de luz LI-COR 6400-02B anexado à câmara de medição (2×3 cm) com um controle de temperatura do bloco configurado para 25°C .

Ao final do período de alagamento e posterior drenagem, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos: I) Área foliar (AF), estimada por meio de um modelo proposto por Richter et al. (2014) utilizando $AF = 2,0185 \times (C \times L)$, (sendo C= maior comprimento da folha e L= maior largura da folha); II) Diâmetro de caule (DC), medido com auxílio de paquímetro digital na base do caule logo acima substrato; III) Massa fresca de raiz (MFR); IV) Volume de raiz (VR) medido pelo deslocamento de água em proveta; V) Massa seca de parte aérea (MSPA), após secagem em estufa a 65°C até atingir peso constante.

Para extração dos teores de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, foram utilizados 0,020 g do limbo livre de nervuras da folha mais jovem completamente expandida e 5 mL de dimetilsulfóxido. Amostra mais reagente foram deixados para reagir em banho maria à 65°C por uma hora, após isso, foram realizadas leituras de absorbâncias em 480, 649 e 665 nm em espectrofotômetro para posterior cálculo e expressão dos resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (Wellburn 1994).

2.3. Análise de enzimas relacionadas à fotorrespiração e metabolismo do nitrogênio

A atividade da enzima glicolato oxidase (GO; EC 1.1.3.1) foi determinada em extrato enzimático obtido pela maceração de 0,250 g de folha com nitrogênio líquido, seguido de homogeneização com 25% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) contendo 0,01% de Triton X-100 e ditioneitol 5 mM. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes usados para os ensaios enzimáticos. A atividade da enzima GO foi mensurada através da formação de glioxilato fenilhidrazona (coeficiente de extinção de $17 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), registrando-se em espectrofotômetro o aumento das absorbâncias a 324 nm, em intervalos de 10 s durante três minutos em um meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), Triton X-100 0,009% (v/v), fenilhidrazona HCl 3,3 mM (pH 6,8) e glicolato 5 mM (pH 7,0) (Bai et al., 2014).

Para avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2), foram macerados 0,300 g de folhas com nitrogênio líquido, homogeneizados com 25% de PVPP (p/v) e 1,5 ml de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,8, contendo MgSO_4 2,5 mM, KCl 2,5 mM, ditioneitol 2 mM, EDTA 0,25 mM, β -mercaptoetanol 1% (v/v), Triton X-100 0,1% (v/v) e glicerol 1% (v/v). O extrato foi centrifugado a 15.000 g por 15 min à 4°C (Hausler et al., 1994). O sobrenadante foi coletado e dessalinizado usando uma coluna Sephadex G-25 médio (PD-10 GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A reação enzimática foi conduzida

em 400 μ L de meio de reação, contendo 150 μ L de amostra, tampão tris HCl 40 mM pH 7,8, hidroxilamina 8 mM, $MgCl_2$ 16 mM, glutamato de sódio 100 mM e ATP 8 mM. O meio de reação foi incubado a 30°C por 30 min e a reação foi paralisada com 600 μ L de reagente paralisante (HCl 0,67 M, $FeCl_3$ 370 mM, ácido tricloroacético 200 mM). Posteriormente à paralização da reação, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por cinco min. A atividade da enzima foi estimada com um espectrofotômetro, detectando as absorbâncias a 535 nm pelo surgimento de γ -glutamil hidroxamato (Cullimore et al., 1982). A quantidade de γ -glutamil hidroxamato foi estimada com curva de calibração com concentrações de até 1 mM.

Para determinação da atividade da enzima glutamato sintase (Fd-GOGAT; EC 1.4.1.7), foi utilizada uma alíquota a partir do mesmo extrato obtido para determinação da enzima GS. A atividade enzima foi quantificada no meio de reação contendo fosfato de potássio 400 mM pH 7,5, L-glutamina 56 mM, 2-oxoglutarato 48 mM, metil viologênio 64 mM, e 100 μ L de extrato enzimático seguido de incubação 25°C por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 25 μ L do agente redutor (NaS_2O_4 300 mM + $NaHCO_3$ 600 mM; v/v) e a reação foi novamente incubada a 25°C por 20 min. Para paralisar a reação, pipetou-se 250 μ L de metanol e agitou-se a reação em vórtex. A atividade específica da enzima foi determinada pela formação de glutamato, para isso o meio de reação foi eluído em coluna cromatográfica de troca aniônica Dowex acetato 200-400 mesh e o teor de glutamato determinado a 506 nm conforme Matoh et al. (1979).

2.4 Atividade das enzimas fermentativas e Ala-At

Amostras de raízes (0,300 g) foram maceradas com nitrogênio líquido, homogeneizadas usando 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, ditioneitol 1 mM e 25% (p/p) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado à 12.000 g à 4°C por 20 min, o sobrenadante foi dessalinizado usando uma coluna PD-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Após eluição das proteínas, alíquotas foram usadas para determinar a atividade das enzimas piruvato descarboxilase (PDC; EC 4.1.1.17), lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.17), álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) e alanina aminotransferase (Ala-At; EC 2.6.1.2). Os ensaios enzimáticos foram realizados monitorando a oxidação do NADH a 340 nm. As atividades de ADH e PDC foram avaliadas seguindo o método proposto por Hanson et al. (1984) com algumas modificações. Para atividade da ADH, a mistura de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 0,6 mM NADH e acetaldeído 5,0 mM. O ensaio para PDC foi monitorado em um meio de reação contendo tampão MES 50 mM (pH 6,0), NADH 0,2

mM, tiamina pirofosfato 0,5 mM, cloreto de magnésio 1 mM, ácido oxâmico 20 mM, 5 unidades de ADH e piruvato de sódio 10 mM. O ensaio da LDH seguiu o método proposto por Hanson e Jacobsen (1984) com algumas modificações: a reação foi monitorada em um meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NADH 0,6 mM, KCN 3,0 μ M, 4-metilpirazol 0,2 mM e piruvato de sódio 10 mM. A atividade de Ala-At continha em seu meio de reação L-alanina 10 mM, 2-oxoglutarato 5 mM, NADH 0,6 mM, Tris/HCl 50 mM (pH 7,5) e 5 unidades de lactato desidrogenase (Good e Muench 1992).

2.5 Teores de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX)

Os extratos para avaliação da concentração de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica foram obtidos pela maceração de folhas e raízes (0,250 g) com nitrogênio líquido, seguido da homogeneização com ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e centrifugação a 13.000 g a 4°C por 20 min. Determinou-se a concentração de H₂O₂ acrescentando ao meio de reação 300 μ L de amostra, tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 1 M, deixando a reação com volume final de 2 mL, seguido de incubação a 30°C durante 30 min. As absorbâncias foram determinadas com espectrofotômetro a 390 nm (Velikova et al. 2000), e as concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em uma curva de calibração de H₂O₂ (0-100 nmoles/mL). Para determinação da peroxidação lipídica utilizou-se como parâmetro a formação de malondialdeído (MDA). Uma alíquota de 300 μ L de amostra vegetal foi incubada por 20 min a 90°C, em um meio reacional (2 mL) contendo ácido tiobarbitúrico 0,5% (p/v) diluído em ácido tricloroacético 10% (p/v). A reação foi paralisada com banho de gelo por 10 min. As absorbâncias foram medidas com espectrofotômetro a 535 e 600 nm e a concentração de MDA foi calculada conforme descrito por Cakmak e Horst (1991).

As atividades das enzimas antioxidantes foram determinadas em folhas e raízes, a partir de amostras com 0,250 g. As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com 2 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,8) contendo EDTA 100 μ M, ácido ascórbico 10 mM e PVPP 25% (p/p). Os extratos foram centrifugados a 12.000 g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático. A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi avaliada monitorando a inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio a 560 nm em meio reacional constituído por tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, 0,1 μ M de EDTA, 75 μ M de nitroblue tetrazólio e 2,0 μ M de riboflavina (Giannopolitis e Ries 1977). A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi avaliada adicionando alíquotas das amostras no meio de reação (200 μ L) contendo tampão

fosfato 200 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM, registrando-se os declínios na absorbância a 240 nm (Azevedo et al. 1998). A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi avaliada em um meio de reação (200 μL) contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM. Determinou-se a oxidação do ascorbato com espectrofotômetro acompanhando-se os decréscimos de absorbância a 290 nm (Nakano e Asada 1981).

2.6 Análise de metabólitos

A extração de ureídeos e aminoácidos foi realizada a partir de amostras de folhas e raízes conforme Bielecki; Turner (1966). Os tecidos vegetais foram homogeneizados em almofariz, utilizando N_2 líquido e posterior adição de 10 mL de solução extratora M:C:W (metanol: clorofórmio: água, na proporção de 12:5:3). As amostras foram deixadas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente na ausência de luz e posteriormente centrifugadas a 600 x g durante 30 minutos em tubos de centrífuga reforçados (marca TPP). A cada 8 mL de sobrenadante obtido, foi acrescentado 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água ultrapura, os quais foram centrifugados novamente a 600 x g durante 30 minutos para obter o extrato aquoso. Esse foi coletado e concentrado por evaporação em banho-maria a 37 °C por 24 horas, com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes.

Os teores dos ureídeos totais, alantoína e ácido alantóico, foram determinados conforme metodologia de Vogels (1970) em folhas e raízes. O procedimento iniciou-se com a hidrólise alcalina da alantoína em alantoato. Para isso, tubos de ensaio contendo uma mistura de 250 μL de amostra diluída em 500 μL de água e 250 μL de NaOH 0,5 N, foram fechados e colocados a 100 °C durante 8 min. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, executou-se a hidrólise ácida do alantoato, em glioxilato e ureia usando 250 μL de HCl 0,65 N. Os tubos foram novamente fechados e incubados a 100°C durante 4 min. Após o resfriamento, os tubos receberam 250 μL de tampão fosfato 0,4 M, pH 7,0 e 250 μL de fenil-hidrazina a 0,33 % seguido de agitação em vórtex e repouso por 5 min. Decorrido este tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo, seguido da adição de 1,25 mL de HCl concentrado gelado e 250 μL de ferricianeto de potássio 1,65%. Após agitação dos tubos em vórtex, os mesmos permaneceram à temperatura ambiente por 15 min e logo em seguida, procedeu-se as leituras de absorbância a 535 nm. A determinação dos níveis de ureídeos foi realizada com base em uma curva de calibração de alantoína em concentrações variando entre 0 e 200 nmol mL^{-1} .

A dosagem de aminoácidos solúveis totais (Aas) foi realizada em raízes e folhas através do método de Yemm e Coocking (1955). Amostras de raízes, nódulos, 16 folhas e exsudatos de xilema (devidamente diluídas em volume final de 1 mL) e/ou padrões de leucina (0-200 nmol mL⁻¹) foram incubados a 100°C durante 20 min com 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% em metil-celulose e 1 mL de KCN 2% em metil-celulose. Posteriormente as amostras foram transferidas para o escuro até atingir temperatura ambiente, em seguida acrescentou-se 1,3 mL de etanol 60% seguido de agitação. As absorbâncias foram determinadas a 570 nm e as concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas com base na curva de calibração de leucina.

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em casa de vegetação. Cada vaso (duas plantas) constituiu uma unidade experimental, com quatro repetições por tratamento. Grupos controle (plantas não alagadas) foram incluídos tanto para condições de alagamento quanto de drenagem. O ensaio enzimático foi realizado em duplicatas para cada unidade experimental, e o resultado foi baseado na média dessas duplicatas. Antes da análise, os dados foram verificados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade, não necessitando de tratamentos. Posteriormente, a análise estatística foi realizada utilizando análise de variância bidirecional (ANOVA). Quando diferenças significativas foram detectadas pelo teste F na ANOVA, as médias entre os tratamentos (conforme indicado nos títulos das figuras) foram comparadas utilizando o teste t com nível de significância de $P < 0,05$ (controle vs alagamento ou controle vs drenagem). Os tratamentos microbiológicos foram comparados dentro das condições hídricas (plantas controle, alagadas, drenadas) usando o teste de Tukey ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R (4.4.3) e os gráficos foram gerados usando SigmaPlot 12.0.

3. RESULTADOS

Durante o experimento, as plantas de soja coinoculadas tornaram-se cada vez mais distintas daquelas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, com os efeitos dos tratamentos mais pronunciados ao final do experimento, após o alagamento, no período de drenagem. Especificamente, as plantas com coinoculação via parte aérea apresentaram área foliar significativamente maiores em comparação às plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. Elas também mantiveram pigmentos fotossintéticos mais elevados como evidenciado por sua coloração verde mais intensa e apresentaram menor abscisão foliar após o

alagamento e a drenagem subsequente. As diferenças visuais representativas entre os tratamentos são mostradas na (Figura 2).



Figura 2: Plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* via parte aérea.

3.1 Efeitos do alagamento nas trocas gasosas de plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

As plantas coinoculadas com *Azospirillum* via folhas quando cultivadas em condições de controle apresentam A ($11,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,37 vezes maior que plantas somente inoculadas *Bradyrhizobium* (Figura 3A). No período de alagamento plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram A ($6,62 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,88 vezes menor que plantas coinoculadas com *Azospirillum* via folhas submetidas ao alagamento (Figura 3A). Não ocorreram diferenças significativas entre plantas alagadas e seus respectivos controles. No período de drenagem não ocorreram diferenças entre os tratamentos microbiológicos. As diferenças foram entre plantas em processo de drenagem e plantas controles, em que na média plantas controles apresentaram A ($10,68 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,47 vezes menor que plantas drenadas.

Plantas coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea quando cultivadas em condições de controle apresentaram g_s ($0,13 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,34 vezes maior que plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, (Figura 3B). Dentre as plantas em condições de alagamento as coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea apresentaram g_s ($0,17 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,76 vezes maior frente às plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. Plantas coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea, quando em condições de alagamento

apresentaram g_s 1,3 vezes maior que seu respectivo par em condições controle. Já plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* não diferiram entre plantas controle e plantas alagadas. No período de drenagem, as plantas não diferiram entre controle e seus respectivos pares em condições de drenagem. O maior valor de g_s foi encontrada em plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* as quais apresentaram g_s ($0,25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,43 vezes maior que plantas coinoculadas via sementes.

O cultivo de plantas independentemente do tratamento microbiológico não caracterizou diferenças significativas na E (Figura 3C). Mesmo em condições de alagamento os tratamentos microbiológicos não diferiram. Já no período de drenagem, as plantas coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea apresentaram E ($6,6 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,43 vezes maior que plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. Os tratamentos de somente inoculação com *Bradyrhizobium* e coinoculação com *Azospirillum* via sementes (não diferiram entre si tampouco diferiram de seus respectivos controles. Plantas em condições de controle coinoculadas com *Azospirillum* na parte aérea apresentaram E ($4,8 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,28 vezes maior que plantas coinoculadas com *Azospirillum* nas sementes em condições controle.

Plantas cultivadas em condições de controle independentemente do tratamento microbiológico não diferiram quanto a C_i ($235,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 3D). Durante o alagamento, plantas coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea apresentaram C_i ($237,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,1 vezes menor que o tratamento de coinoculação via sementes em condições de alagamento e plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram C_i de ($266,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,1 vezes maior que seu respectivo controle. No período de drenagem as plantas drenadas coinoculadas via sementes, apresentaram C_i ($258,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 1,04 vezes menor que seus respectivos controles.

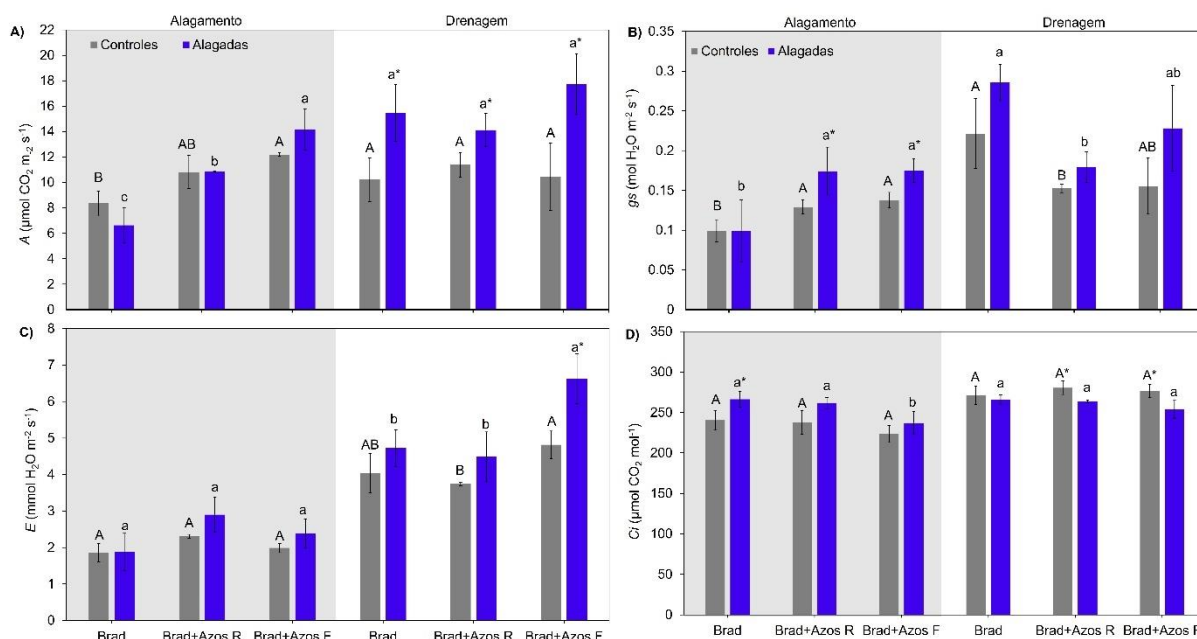


Figura 3: Assimilação líquida de CO₂ (*A*) (A), condutância estomática (*g_s*) (B), transpiração (*E*) (C) e concentração interna de CO₂ (*C_i*) (D) em plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média ± DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; P <0,05), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, P <0,05). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.2 Efeitos do alagamento no metabolismo fotorrespiratório e nitrogenado de plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

As plantas controle com coinoculação de *Azospirillum* via parte aérea, apresentaram atividade de GO (0,90 μmol glx mg prot⁻¹ h⁻¹), 1,28 vezes menor que o tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium* (Figura 4A). Plantas alagadas independentemente do tratamento microbiológico, apresentam atividade da enzima GO maior que plantas em condições controle. A maior diferença foi encontrada em plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (2,10 μmol glx mg prot⁻¹ h⁻¹) com 1,73 vezes mais atividade que seu respectivo controle e 1,39 vezes mais atividade que o tratamento de coinoculação com *Azospirillum* via sementes em condições de alagamento. Os tratamentos de coinoculação com *Azospirillum* não diferiram entre si durante o alagamento. No período de drenagem, as plantas em condições de controle mantiveram o comportamento apresentado na primeira coleta. Já as plantas sob drenagem, se coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea reduziram a atividade de GO (1,05 μmol glx mg prot⁻¹ h⁻¹) para níveis de seus respectivos controles. Plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, apresentaram atividade de GO (1,79 μmol glx mg prot⁻¹ h⁻¹), 1,48 vezes maior que seu respectivo controle.

As plantas controles coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea, apresentaram atividade de GS ($28,33 \mu\text{mol Gln mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$), 1,23 vezes maior que o tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium* (Figura 4B). Já as plantas submetidas ao alagamento independentemente do tratamento de inoculação aumentaram a atividade da GS, sendo que aquelas inoculadas somente com *Bradyrhizobium* apresentaram a maior atividade ($48,8 \mu\text{mol glx mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 2,07 vezes mais em relação ao seu respectivo controle. Plantas coinoculadas com *Azospirillum* via parte aérea apresentaram durante o alagamento atividade de GS ($36,5 \mu\text{mol Gln mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 1,24 vezes menor que o tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium*. No período de drenagem o comportamento das plantas em condições de controle apresentou o mesmo comportamento da primeira coleta. Já as plantas drenadas se coinoculadas, apresentaram a mesma atividade que seus respectivos controles. Enquanto plantas somente inoculadas mantiveram a atividade da enzima GS ($33,7 \mu\text{mol Gln mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 1,5 vezes maior que seu respectivo controle e 1,32 vezes maior que o tratamento de coinoculação via sementes quando drenado.

As plantas controles coinoculadas via parte aérea, apresentam atividade de Fd-GOGAT ($286,9 \mu\text{mol Glu mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$), 1,10 vezes maior que o tratamento de somente inoculação (Figura 4C). Plantas submetidas ao alagamento independentemente do tratamento aumentam a atividade da enzima Fd-GOGAT, sendo no tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium* foi observado o maior aumento ($407,51 \mu\text{mol Glu mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 1,56 vezes maior em relação ao seu respectivo controle. Plantas com coinoculação via parte aérea durante o alagamento apresentaram a atividade de Fd-GOGAT ($345,84 \mu\text{mol Glu mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 1,11 vezes menor do que a atividade do tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium*. No período de drenagem o comportamento das plantas em condições de controle apresentou o mesmo comportamento da primeira coleta. Já as plantas sob drenagem, se coinoculadas, apresentaram a mesma atividade que seus respectivos controles. Enquanto plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* mantiveram a atividade da enzima Fd-GOGAT ($309,57 \mu\text{mol Glu mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 1,25 vezes maior que seu respectivo controle e 1,15 vezes maior que o tratamento coinoculado via sementes quando drenado.

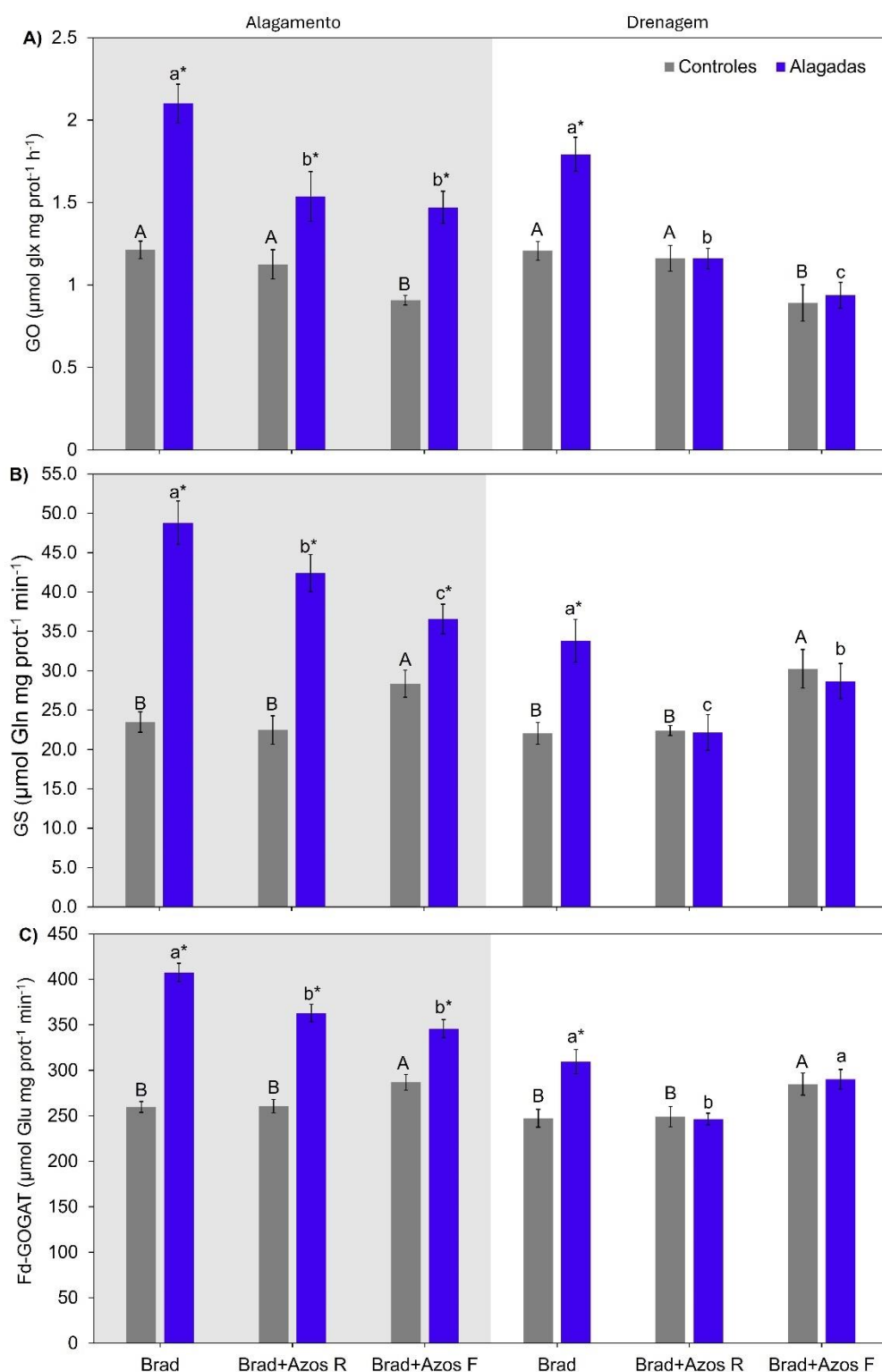


Figura 4: Atividade enzimática da glicolato oxidase (GO) (A), glutamina sintetase (GS) (B) e glutamato sintase (Fd-GOGAT) (C) em folhas de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.3 Efeitos do alagamento na concentração de pigmentos de plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

Em plantas coinoculadas via parte aérea cultivadas em condições de controle, o teor de clorofila total ($0,88 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) foi 1,14 vezes maior em relação a plantas somente inoculadas (Figura 5A). Plantas coinoculadas cultivadas em condições de controle não diferiram entre si. Durante o alagamento, as plantas coinoculadas via parte aérea não reduziram o teor de clorofila total em relação ao seu respectivo controle enquanto o tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium* reduziu em 1,25 vezes. Ainda o tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium* ($0,61 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) reduziu em 1,24 vezes o teor de clorofila total frente ao tratamentos de coinoculação via sementes quando em condições de alagamento. No período de drenagem, o comportamento das plantas em condições de controle se manteve igual ao da primeira coleta. Porém as plantas coinoculadas via sementes durante a recuperação, aumentaram os valores de clorofila total ($0,63 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$), sem atingir os níveis de seu respectivo controle. Já nas plantas coinoculadas via parte aérea, os teores de clorofila total mantiveram-se aos níveis do controle e representaram um valor 1,77 vezes maiores do que em plantas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* ($0,46 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$).

O conteúdo de carotenoides em plantas controles coinoculadas via sementes ($0,10 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) representou um valor 1,20 vezes maior que o tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium*, não havendo diferença entre o tratamento de coinoculação via parte aérea (Figura 5B). Plantas com coinoculação via parte aérea não reduziram a concentração de carotenoides ($0,077 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) em relação ao seu respectivo controle e não diferiram de plantas alagadas do tratamento de coinoculação via sementes, sendo 1,01 vezes maior que o tratamento de somente inoculação. Nas plantas sob os tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* e coinoculação via sementes, o conteúdo de carotenoides reduziu durante o alagamento em 1,34 e 1,30 vezes frente aos seus respectivos controles. Na drenagem o conteúdo de carotenoides em plantas controles do tratamento de coinoculação via parte aérea ($0,1 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) foi 1,16 vezes maior que o conteúdo de plantas coinoculadas via sementes e 1,51 vezes maior que o tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium*, além de não diferir de seu par drenado. O conteúdo de carotenoides em plantas sob drenagem dos tratamentos inoculação com *Bradyrhizobium* ($0,052 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) e coinoculação via sementes ($0,066 \text{ mg}^{-1} \text{ g MF}$) representaram valores 0,98 e 1,33 vezes menores que seus respectivos controles.

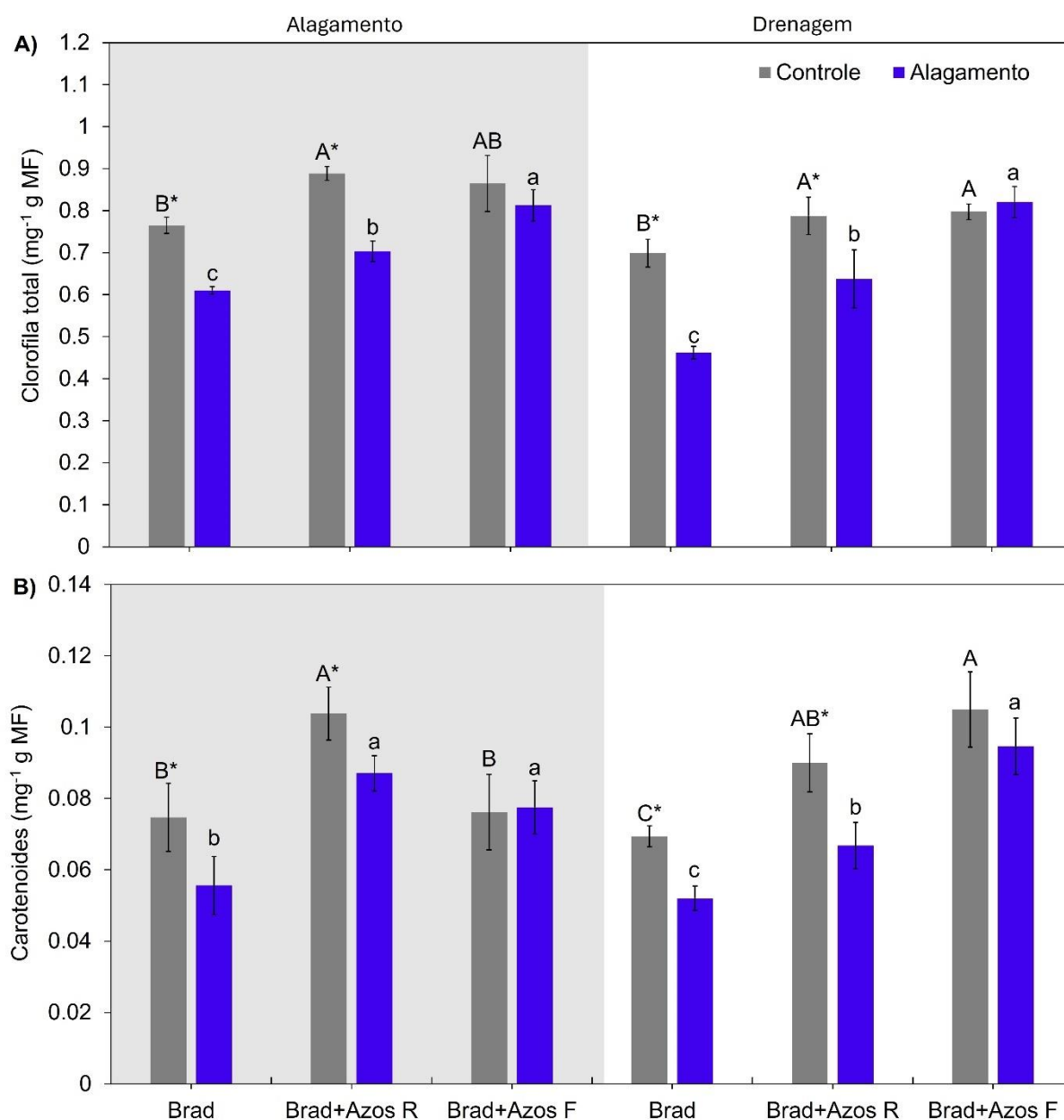


Figura 5: Teores de clorofila total (A) e carotenoides (B) em plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.4 Efeitos do alagamento na produção de H₂O₂ e peroxidação lipídica em plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

3.4.1 H₂O₂ e peroxidação lipídica em folhas

As plantas controles do tratamento de coinoculação via parte aérea, apresentaram a maior concentração de H₂O₂ em folhas (193,05 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), não diferindo de seu par em condições de alagamento (Figura 6A). O tratamento de coinoculação via parte aérea em condições de controle apresentou 1,14 vezes mais H₂O₂ em folhas que o tratamento inoculação com *Bradyrhizobium* e 1,68 vezes mais H₂O₂ que o tratamento de coinoculação via sementes. Porém as plantas sob os tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* (189,15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e coinoculação via sementes (160 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), quando alagadas aumentaram a concentração de H₂O₂ em folhas em 1,12 e 1,29 vezes em relação aos seus respectivos controles. No período de drenagem os tratamentos de coinoculação via sementes e via parte aérea não diferiram de seus respectivos controles quanto à concentração de H₂O₂ em folhas, apresentando valores de 143,66 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF e 159 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF, respectivamente. Já plantas apenas inoculadas com *Bradyrhizobium* em condição de drenagem mantiveram o conteúdo de H₂O₂ em folhas (208,32 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), sendo 1,45 vezes maior que seu respectivo par de plantas controle e 1,37 vezes maior que os tratamentos de coinoculação drenados. Ainda as plantas do tratamento de somente inoculação em condições de controle apresentaram as maiores concentrações de H₂O₂ (187,90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), 1,13 vezes maior que plantas do tratamento de coinoculação com *Azospirillum* via parte aérea.

A peroxidação de lipídeos, estimada pelos teores de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas controle somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (Brad) (63,54 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), foi 1,13 vezes maior do que os encontrados nas plantas controle do tratamento de coinoculação via parte aérea (Figura 6B). Em plantas alagadas a concentração de MDA em folhas de plantas do tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium* (84,29 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) foi 1,7 vezes maior que a concentração em folhas de plantas coinoculadas via sementes. No período de drenagem a concentração de MDA nas folhas de plantas em condições controles do tratamento de somente inoculação com *Bradyrhizobium* (53,91 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), não diferiu de seu respectivo controle e foi 1,21 / 1,22 vezes maior que os tratamentos de coinoculação via sementes e parte aérea respectivamente. Plantas sob drenagem do tratamento de coinoculação com *Azospirillum* em parte aérea apresentou teores de MDA (48,7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) equivalentes aos seus respectivos controles, equivalendo a uma concentração de MDA 1,06

vezes menor em relação ao encontrado em folhas de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*.

3.4.2 H₂O₂ e peroxidação lipídica em raízes

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes de plantas alagadas não diferiu em função do tratamento de alagamento (Figura 6C). Porém a concentração de H₂O₂ em raízes de plantas do tratamento de coinoculação via sementes (11,97 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) representou um valor 1,59 vezes menor do que o encontrado em plantas do tratamento de coinoculação via parte aérea e 1,34 vezes menor que do tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium*. O tratamento com maior produção de H₂O₂ em raízes foi o tratamento de coinoculação via parte aérea 19,08 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. No período de drenagem, a concentração de H₂O₂ em raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (17,90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) foi 1,29 vezes maior que seu respectivo controle e 1,24 / 1,20 vezes maior que a concentração de H₂O₂ em raízes de plantas coinoculadas via parte aérea e via sementes respectivamente. A concentração de H₂O₂ em raízes de plantas controles somente inoculados com *Bradyrhizobium* não diferiu de plantas coinoculadas via sementes, mas foi 1,26 vezes maior que a concentração encontrada em plantas coinoculadas via parte aérea. Independentemente do tratamento microbiológico, plantas em condições de drenagem apresentaram maiores níveis de H₂O₂ em raízes que seus respectivos controles.

A peroxidação lipídica (MDA) em raízes de plantas alagadas, independentemente do tratamento de inoculação, foi maior em comparação aos seus respectivos controles (Figura 6D). As raízes das plantas sob o tratamento de inoculação apenas com *Bradyrhizobium* apresentaram durante o alagamento, a concentração de MDA (25,96 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) 1,31 vezes maior do que plantas alagadas do tratamento de coinoculação via sementes e 1,46 vezes maior do que a concentração em raízes de plantas coinoculadas via parte aérea. As raízes de plantas alagadas sob o tratamento de coinoculação via parte aérea (17,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,38 vezes mais MDA em comparação às raízes de plantas controle. No período de drenagem a concentração de MDA em raízes de plantas coinoculadas não diferiu entre plantas controles e drenadas. Porém plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram MDA em raízes de plantas sob drenagem 1,88 vezes maior do que em raízes de plantas controles. A concentração de MDA em raízes de plantas coinoculadas (11,15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) cultivadas em condições de controle independentemente da forma de coinoculação foi 1,57 vezes maior que em plantas somente inoculadas.

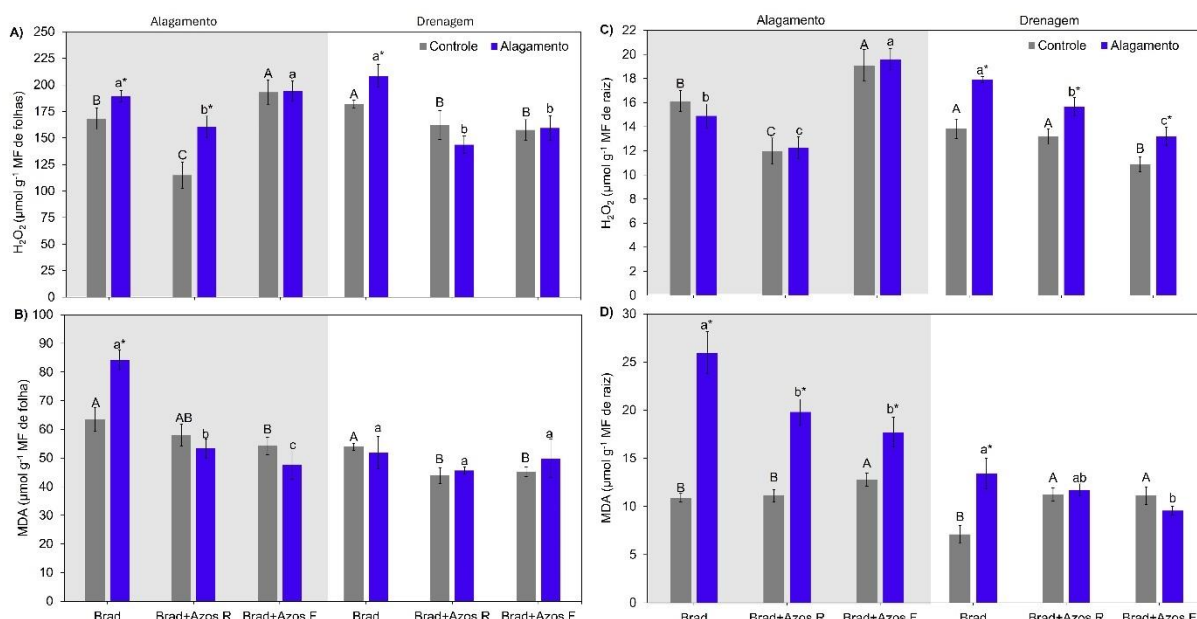


Figura 6: Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), malondialdeído (MDA) (B) em folhas, H₂O₂(C) e MDA (D) em raízes de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; P <0,05), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, P <0,05). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.5 Efeitos do alagamento nas enzimas do sistema antioxidante de plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

3.5.1 Enzimas do sistema antioxidante em folhas

Durante o período de alagamento não houve aumento da atividade da enzima SOD em folhas de plantas coinoculadas alagadas quando comparadas com seus respectivos controles (Figura 7A). Entretanto a atividade da SOD em plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (Brad) quando alagadas (9,23 U mg prot⁻¹ min⁻¹) foi 1,3 vezes maior que seu respectivo controle (7,09 U mg prot⁻¹ min⁻¹), o qual representou uma atividade 1,21 vezes menor que a encontrada para a enzima em folhas de plantas controles dos tratamentos de coinoculação. Plantas em condições de alagamento não diferiram em função do tratamento microbiológico. No período de drenagem plantas do tratamento Brad apresentaram atividade de SOD em folhas (6,88 U mg prot⁻¹ min⁻¹) 1,53 vezes maior que seu respectivo controle, não diferindo dos tratamentos de coinoculação em condições de drenagem. As plantas coinoculadas em condições de drenagem não diferiram de seus respectivos controles e as plantas controle coinoculadas via sementes (6,55 U mg prot⁻¹ min⁻¹) apresentaram atividade

1,56 vezes maior do que plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* e ou coinoculadas via parte aérea.

As plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* quando cultivadas em condições de controle apresentaram atividade de CAT ($37,59 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,07 vezes menor que seu respectivo par em condições de alagamento e 2,03 vezes mais atividade enzimática que folhas de plantas coinoculadas em condições de controle (Figura 7B). Em plantas coinoculadas via sementes, a atividade da CAT não diferiu de seu respectivo controle no período de alagamento ($26,25 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), porém foi 1,4 vezes maior do que em plantas coinoculadas via parte aérea sob alagamento. Esse grupo de plantas apresentou atividade de CAT em folhas ($18,66 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,64 vezes maior que seu respectivo controle. No período de drenagem, as plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram atividade da CAT ($21,89 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,46 vezes maior do que seu respectivo controle e 1,53 vezes maior que plantas coinoculadas em fase de drenagem. Ainda, neste período, as atividades da CAT em folhas de plantas coinoculadas não diferiram de seus respectivos controles.

As plantas alagadas, independentemente do tratamento microbiológico, aumentaram 1,36 vezes a atividade da enzima APX em folhas comparada aos seus respectivos controles (Figura 7C). Os grupos cultivados sob os tratamentos de coinoculação submetidos a condições de alagamento apresentaram atividade ($29,720 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,37 vezes maior do que plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. A atividade enzimática não foi alterada devido à forma de coinoculação, entretanto plantas controles coinoculadas apresentaram atividades 1,6 vezes maiores do que plantas somente inoculadas em condições de controle. No período de drenagem a atividade de APX em plantas controle não diferiu devido ao tratamento microbiológico, porém plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* quando em processo de drenagem, apresentam atividade de APX em folhas ($36,92 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,5 vezes maior do que seu respectivo controle. Já as plantas coinoculadas via sementes, no período de drenagem apresentaram atividade enzimática de APX ($30,86 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,28 vezes maior do que seu respectivo controle. Enquanto plantas coinoculadas via parte aérea apresentaram atividade de APX ($25,77 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 1,14 vezes maior de seu controle e 1,43 vezes menor que plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*.

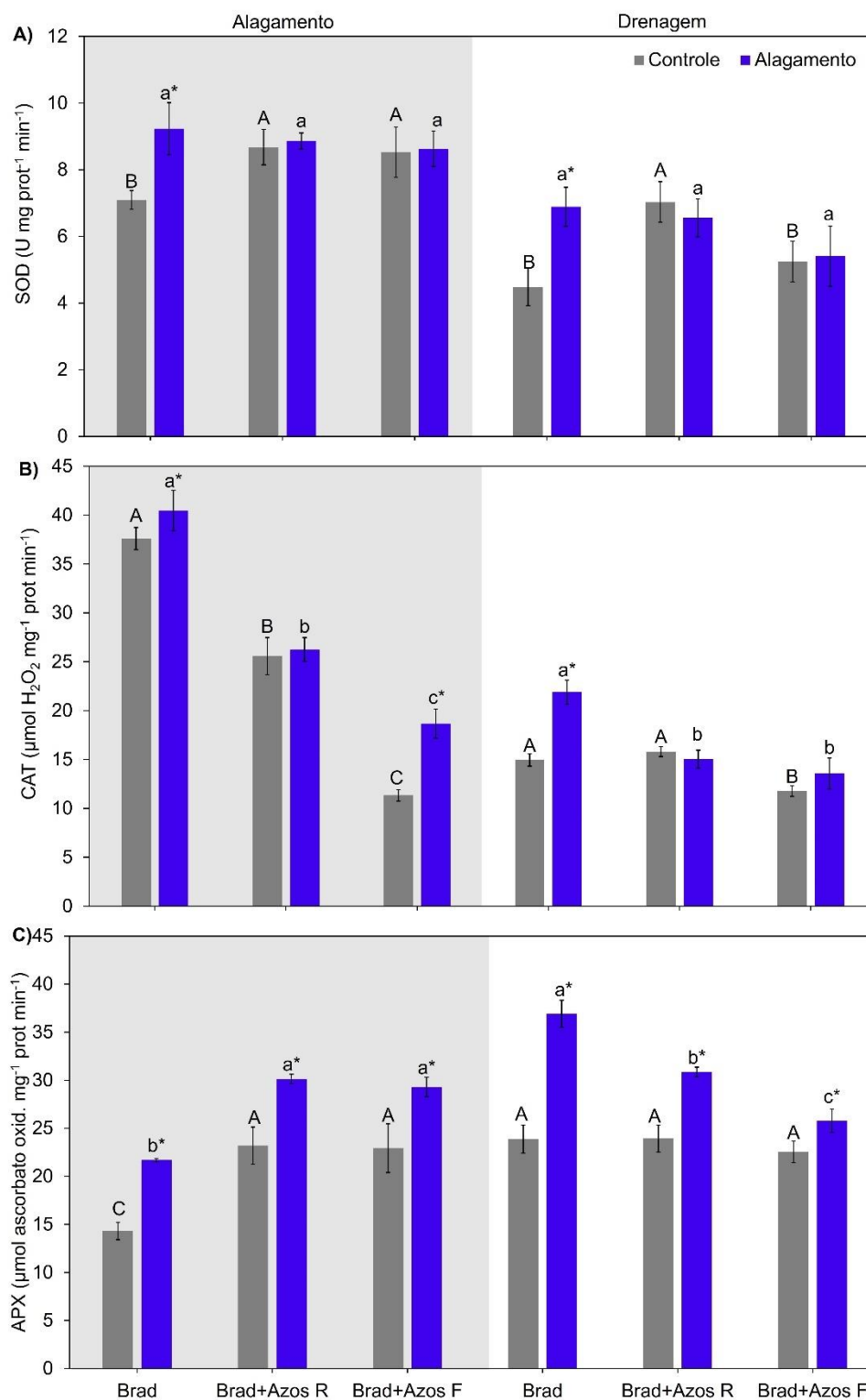


Figura 7: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em folhas de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.5.2 Enzimas do sistema antioxidante em raízes

As raízes de plantas alagadas independentemente do tratamento microbiológico aumentaram a atividade da SOD frente aos seus respectivos controles (Figura 8A). Em condições de controle as plantas não diferiam em função do tratamento microbiológico. As plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, quando alagadas apresentaram atividade da SOD ($29,40 \text{ U mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$), 1,29 vezes maior que seu respectivo controle e 1,13 vezes menor que qualquer tratamento de coinoculação em condição de alagamento e, nas plantas coinoculadas a atividade da SOD ($38,74 \text{ U mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$) foi 1,58 vezes maior em relação aos seus pares em condições de controle. No período de drenagem a atividade da SOD em raízes de plantas somente inoculadas (Brad), sob recuperação ($16,95 \text{ U mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$) foi 2,25 vezes maior em relação ao seu respectivo controle. Em plantas coinoculadas via sementes sob drenagem, a atividade ($214,54 \text{ U mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$) foi 1,82 vezes maior que seu respectivo controle e 1,23 vezes maior do que em raízes de plantas coinoculadas via parte aérea em condições de recuperação. As plantas coinoculadas via parte aérea em condições de drenagem apresentaram atividade da SOD 1,38 vezes maior que seu par em condições de controle.

As plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram um aumento de atividade da enzima CAT durante o alagamento ($117,58 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) de 1,19 vezes o seu controle (Figura 8B). Já as plantas coinoculadas independentemente da forma, durante o período de alagamento não diferiram de seus respectivos controles. As raízes de plantas coinoculadas em condições de alagamento apresentaram atividade de CAT ($192,21 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,77 vezes maior do que raízes de plantas somente inoculadas (Brad) em condições de alagamento. No período de drenagem, as plantas coinoculadas cultivadas em condições de controle apresentaram atividade da CAT ($139,46 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,46 vezes maior que plantas somente inoculadas. As raízes de plantas coinoculadas em fase de drenagem não diferiram devido a coinoculação, entretanto apresentaram atividade da CAT 1,54 vezes mais altas em comparação com raízes de plantas em condições de controle.

As raízes de plantas alagadas não tiveram aumento da atividade da enzima APX em relação aos seus respectivos controles (Figura 8C). As plantas coinoculadas cultivadas em condições de controle não diferem em função da forma de coinoculação e apresentam atividade de APX ($138,51 \text{ } \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 1,7 vezes maior do que plantas somente inoculadas. As raízes de plantas coinoculadas via parte aérea durante o

período de alagamento apresentaram atividade de APX ($161,15 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) representando um valor 1,61 vezes maiores do que seu respectivo controle e 2,17 vezes maior do que a atividade da enzima em raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. No período de drenagem independentemente do tratamento microbiológico a atividade da enzima APX em raízes de plantas em processo de drenagem foi maior que em seus respectivos controles. As raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* cultivadas em condições de controle apresentam as menores atividades da enzima APX ($63,70 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), representando um valor 1,6 vezes menor que seu par em condições de drenagem. As raízes de plantas coinoculadas via sementes sob drenagem, apresentaram a maior atividade de APX ($206,02 \mu\text{mol ascorbato oxidado mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 2,12 vezes maior do que a atividade de seu respectivo controle, e 2 vezes maior do que em plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, não diferindo de plantas coinoculadas via parte aérea.

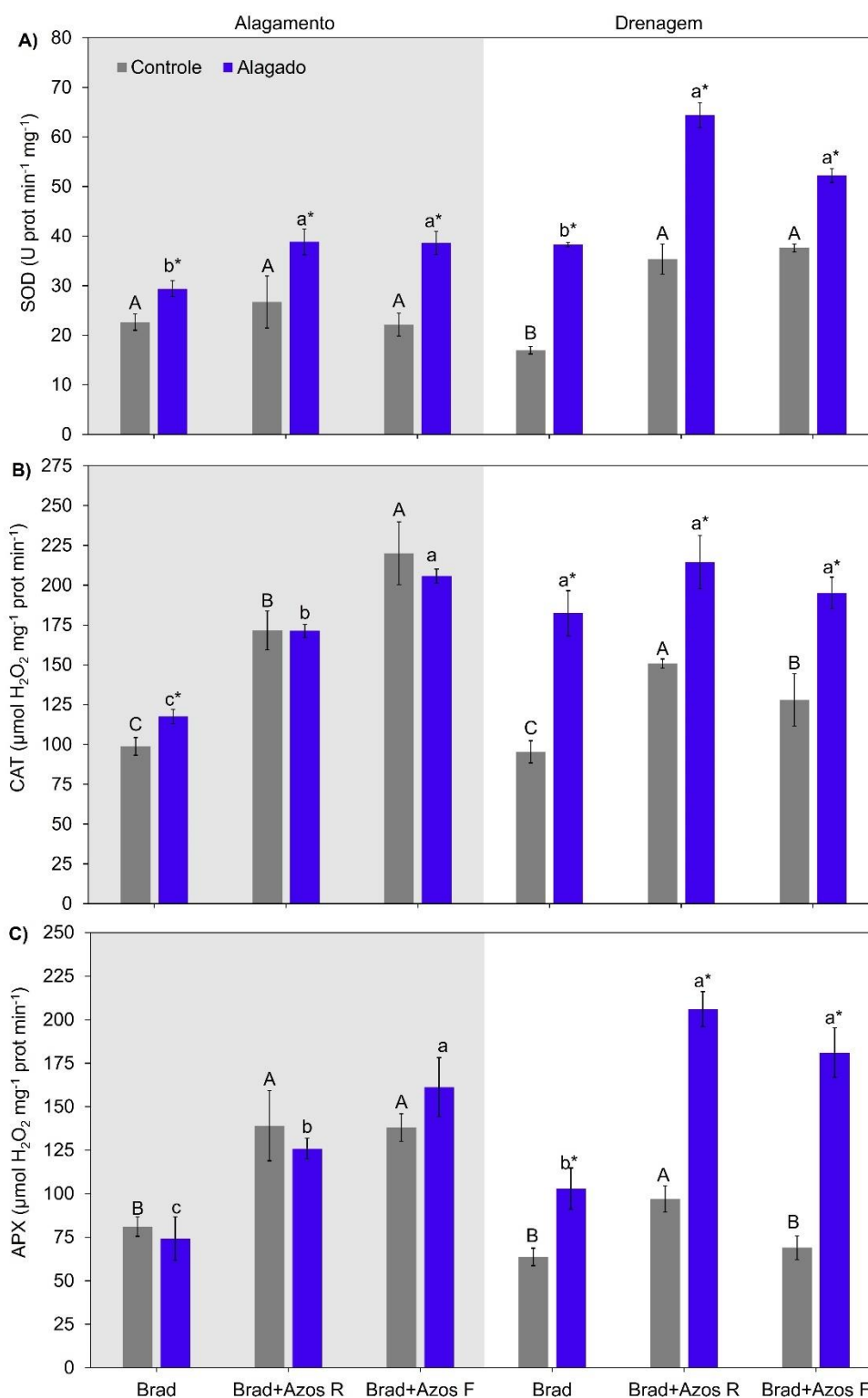


Figura 8: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em raízes de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.6 Efeitos do alagamento no metabolismo fermentativo de plantas de soja coinoculadas em diferentes órgãos

Nas raízes de plantas alagadas a atividade da enzima piruvato descarboxilase (PDC) aumentou em relação aos seus respectivos controles, independentemente do tratamento microbiológico (Figura 9A). As raízes de plantas sob alagamento não apresentaram diferença na atividade da PDC em função do tratamento de coinoculação ($0,12 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), mas o valor representou uma atividade 2,015 vezes maior do que o encontrado em raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. No período de drenagem as plantas coinoculadas apresentaram atividade mínima ($0,002 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), atividade equiparada aos níveis de controle, plantas somente inoculadas (Brad) apresentaram atividade de $0,027 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$, 11,1 vezes maior que plantas coinoculadas.

As raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* quando alagadas apresentaram aumento significativo na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) ($0,013 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 1,89 vezes menor que o tratamento de coinoculação via sementes e 2,83 vezes menor que o tratamento de coinoculação via parte aérea (Figura 9B). As plantas sob o tratamento de coinoculação via parte aérea apresentaram a maior atividade da enzima LDH ($0,036 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 1,5 vezes maior que o tratamento de coinoculação via sementes. No período de drenagem plantas somente inoculadas apresentaram a maior atividade de LDH ($0,019 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) 53,4 vezes maior que plantas coinoculadas. Raízes das plantas dos tratamentos de coinoculação no período de drenagem apresentaram atividade de LDH equiparada aos níveis de seus controles não diferindo entre si.

A atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) aumentou expressivamente nas raízes das plantas sob alagamento; em plantas somente inoculadas (Brad) a atividade da enzima ADH ($0,048 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) foi 2,13 vezes menor do que plantas coinoculadas (Figura 9C) e em raízes de plantas coinoculadas a atividade não diferiu estatisticamente entre os dois tratamentos de coinoculação. No período de drenagem, as raízes de plantas somente inoculadas (Brad) apresentaram atividade da ADH ($0,19 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 1,26 vezes maior do que plantas coinoculadas via sementes e 15,3 vezes maior do que plantas coinoculadas via parte aérea. Raízes de plantas coinoculadas via parte aérea apresentaram a menor atividade enzimática de ADH ($0,012 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), mesmo assim 31,8 vezes maior que seu respectivo controle.

A atividade da enzima alanina aminotransferase (Ala-At) em raízes de plantas controles não diferiu entre os tratamentos microbiológicos (Figura 9D). As raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (Brad) quando em condições de alagamento apresentaram a maior atividade de Ala-At ($0,082 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), 5,8 vezes maior que seu respectivo controle e equivalente à atividade em raízes de plantas coinoculadas via sementes ($0,07 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), entretanto, nesse tratamento, a atividade foi 28,2 vezes maior que seu respectivo controle. Em plantas coinoculadas via parte aérea ($0,06 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), a atividade da Ala-At não diferiu de plantas coinoculadas via sementes, mas foi 1,36 vezes menor que a atividade encontrada em raízes de plantas somente inoculadas (Brad) e 7,8 vezes maior que a atividade de seu respectivo controle. No período de drenagem a atividade de Ala-At em raízes de plantas somente inoculadas (Brad) ($0,079 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), foi 19,47 vezes maior que os tratamentos de coinoculação. A atividade de Ala-At em raízes drenadas de plantas coinoculadas não diferiu entre os tratamentos microbiológicos ($0,003 \text{ mmol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) os quais mesmo assim foram.

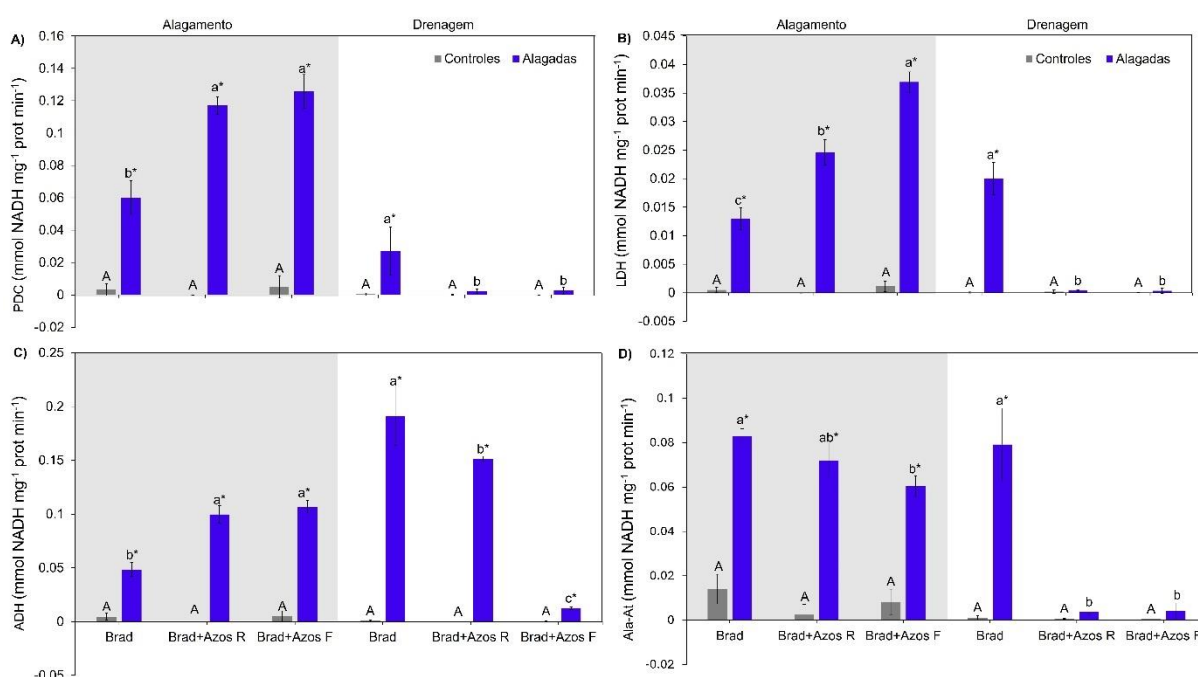


Figura 9: Atividade da enzima piruvato descarboxilase (PDC) (A), lactato desidrogenase (LDH) (B), álcool desidrogenase (ADH) (C) e alanina aminotransferase (Ala-At) (D) em raízes de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.7 Efeitos do alagamento na concentração de aminoácidos e ureídeos em plantas de soja coinoculadas em diferentes órgãos

3.7.1 Concentração de aminoácidos em folhas e raízes

A concentração de Aas em folhas de plantas controle não variou entre os tratamentos de coinoculação (Figura 10A). As folhas de plantas coinoculadas em condições controle ($10,34 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), apresentaram 1,28 vezes mais Aas que folhas de plantas somente inoculadas, independentemente do período de avaliação (coleta de alagamento ou coleta de reoxigenação). Folhas de plantas coinoculadas em condições de alagamento apresentaram concentração de Aas ($3,31 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) 2,5 vezes menor seus respectivos controles. Já plantas somente inoculadas (Brad), quando em condição de alagamento ($7,66 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), não diferiram de seu respectivo controle, e apresentaram 2,31 vezes mais Aas que os tratamentos coinoculados, quando submetidos ao alagamento. No período de drenagem, as folhas de plantas coinoculadas via parte aérea ($5,79 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,95 vezes mais Aas que os demais tratamentos drenados. A concentração de Aas em raízes de plantas drenadas do tratamento de coinoculação via sementes ($2,71 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) não diferiu do tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium*, concentração 2,13 vezes menor do que a encontrada em folhas do tratamento de coinoculação via parte aérea.

As raízes de plantas coinoculadas em condições de controle ($15,45 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,17 vezes mais Aas do que em raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (Figura 10B). Já em condições de alagamento, as plantas, acumularam Aas em suas raízes, independentemente do tratamento. As raízes de plantas somente inoculadas (Brad) em condições de alagamento ($32,06 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) acumularam 2,4 vezes mais Aas que seu respectivo controle, enquanto raízes de plantas coinoculadas via sementes ($24,75 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) ou via parte aérea ($18,34 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) mostraram aumentos de 1,55 e 1,22 vezes, respectivamente. No período de drenagem, as raízes de plantas coinoculadas em condições de controle ($28,96 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), permaneceram com uma concentração de Aas 1,34 vezes maior do que plantas somente inoculadas (Brad). As raízes de plantas sob drenagem somente inoculadas ($24,99 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram acúmulo de Aas 1,15 vezes maior do que seu respectivo controle. Já as raízes de plantas drenadas coinoculadas via parte aérea ($25,92 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) não diferiram de seu respectivo controle e raízes de plantas coinoculadas via sementes apresentaram concentração de Aas ($24,57 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) 1,33 vezes menor.

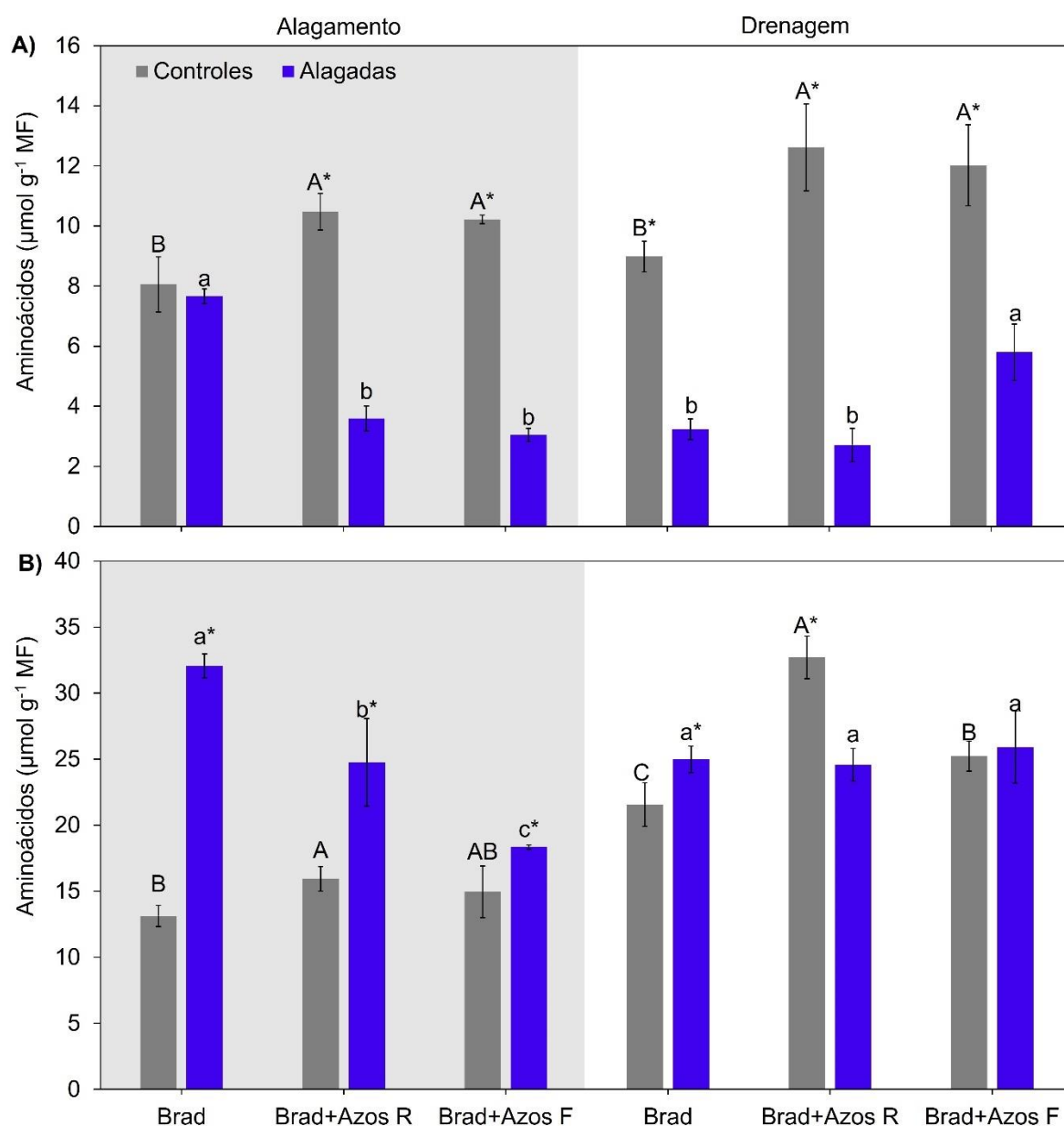


Figura 10: Concentração de aminoácidos (Aas) em folhas (A) e raízes (B), de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.7.2 Concentração de Ureídeos em folhas e raízes

As folhas de plantas cultivadas em condições controlem ($10 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) não apresentaram diferença na concentração de Ure devido à coinoculação (Figura 11A). Porém as folhas de plantas alagadas ($7,89 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), reduziram em 1,26 vezes a concentração de Ure frente aos seus respectivos controles. Nas plantas do tratamento de coinoculação via sementes ($8,84 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), a redução foi somente 1,15 vezes a em relação ao seu próprio controle, apresentando 1,19 vezes mais Ure em folhas em comparação aos demais tratamentos em condições de alagamento. No período de drenagem as folhas de plantas controles coinoculadas ($8,16 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,20 vezes mais Ure do que as plantas somente inoculadas (Brad). As plantas controlem coinoculadas via sementes ($9,84 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,13 vezes mais Ure que plantas com coinoculação via parte aérea. Porém as plantas do tratamento de coinoculação via parte aérea foi o único tratamento que no período de drenagem atingir os níveis de controle ($7,93 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF).

As raízes de plantas coinoculadas cultivadas em condições de controle no período de alagamento apresentaram 1,6 vezes mais Ure ($7,05 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) do que em raízes de plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium* (Figura 11B). Raízes de plantas coinoculadas quando alagadas ($6,10 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), apresentam redução de 1,15 vezes na concentração de Ure frente a seus respectivos controles. O tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium* não apresentou redução na concentração de Ure frente ao seu respectivo controle. No período de drenagem, os teores de Ure das raízes de plantas coinoculadas em condições de controle não diferiram entre si ($7,32 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e mantiveram-se 1,32 vezes maior do que em raízes de plantas somente inoculadas (Brad). As raízes de plantas coinoculadas em condição de drenagem ($7,07 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) apresentaram 1,37 vezes mais Ure do que raízes de plantas somente inoculadas (Brad), porém as plantas do tratamento de coinoculação via sementes mantiveram a concentração de Ure inferior ao respectivo controle ($6,48 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), correspondendo a 1,07 vezes menos.

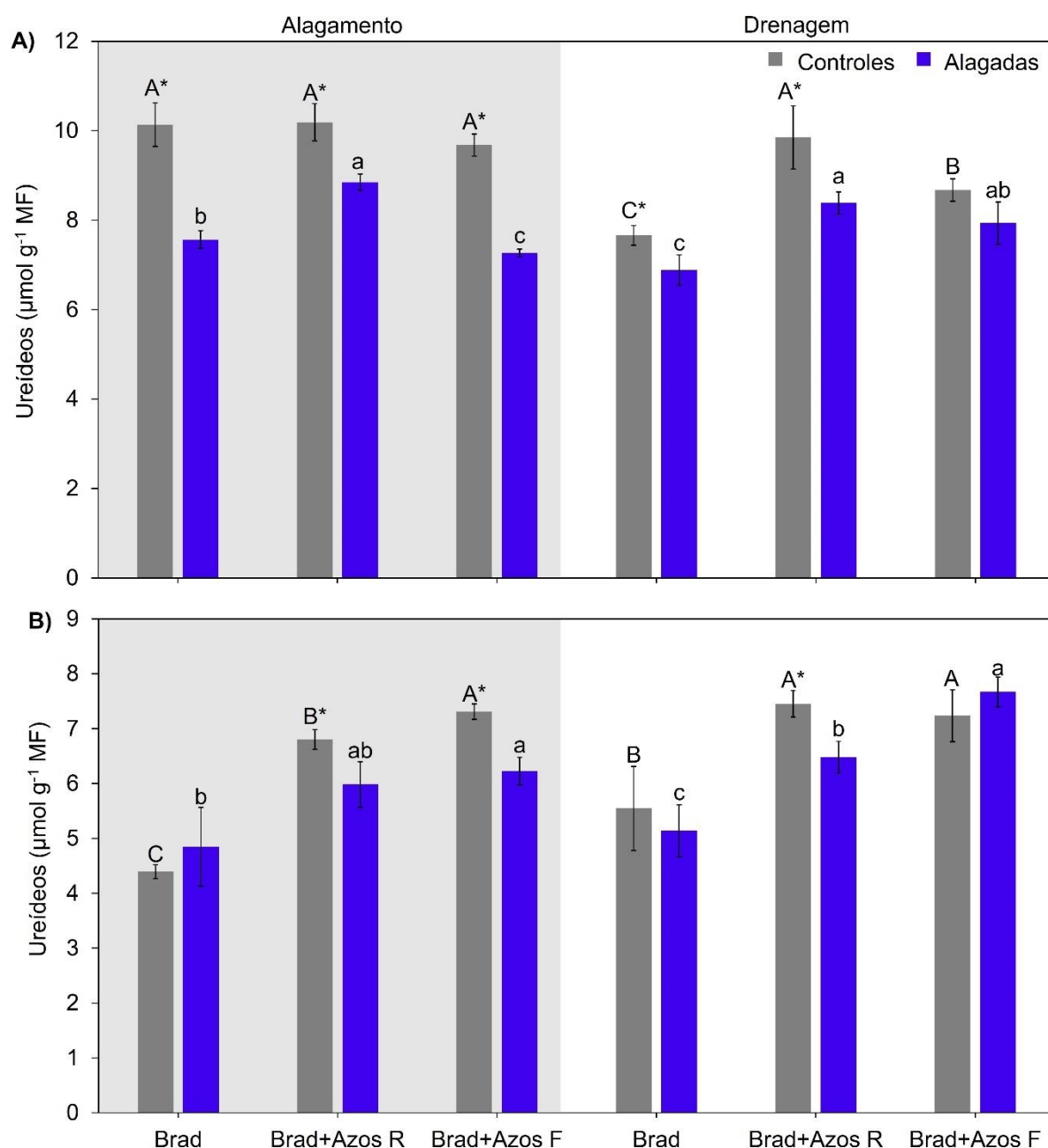


Figura 11: Concentração de ureídeos (Ure) em folhas (A) e raízes (B), de plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, $n=4$. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t ; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR-coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

3.8 Efeitos do alagamento nos parâmetros biométricos de plantas de soja coinoculadas com *Azospirillum* em diferentes órgãos

A massa seca de parte aérea não foi alterada em função do alagamento em nenhum dos tratamentos (Figura 12A). As plantas coinoculadas via sementes em condições de controle apresentaram a maior massa seca de parte aérea ($1,9 \text{ g}^{-1}$ planta), não diferindo de seu par em condições de alagamento e não diferindo do tratamento de coinoculação via parte aérea. As plantas do tratamento de inoculação apenas com *Bradyrhizobium* (Brad) em condições de controle apresentaram a menor massa seca de parte aérea ($0,89 \text{ g}^{-1}$ planta), igual ao seu par em alagamento e 2,11 vezes menor do que qualquer outro tratamento. No período de drenagem, a massa seca da parte aérea das plantas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium*, seja em recuperação ($1,9 \text{ g}^{-1}$ planta) ou em condições de controle ($2,29 \text{ g}^{-1}$ planta) foi 1,55 vezes menor que a média dos tratamentos de coinoculação. O tratamento de coinoculação via parte aérea em condições de controle ($3,68 \text{ g}^{-1}$ planta) foi equivalente ao tratamento de coinoculação via sementes em condições de controle. As plantas do tratamento de coinoculação via sementes em condições de drenagem apresentaram massa seca de parte aérea ($2,55 \text{ g}^{-1}$ planta), 1,36 vezes menor que plantas coinoculadas via parte aérea.

A massa seca de raízes de plantas somente inoculadas (Brad) em condições de controle ($0,36 \text{ g}^{-1}$ planta), não diferiu de seu par em condições de alagamento ($0,33 \text{ g}^{-1}$ planta) (Figura 12B). As plantas cultivadas sob esse tratamento microbiológico e apresentaram a menor massa seca de raízes, independentemente da condição hídrica, sendo 1,8 vezes menor que a média dos tratamentos de coinoculação independentemente da condição hídrica ou forma de coinoculação. Os tratamentos de coinoculação não diferiram entre si durante o alagamento ($0,36 \text{ g}^{-1}$ planta) e não diferiram de seus respectivos controles. No período de drenagem não houve diferença entre os tratamentos, independentemente da condição hídrica ou microbiológica.

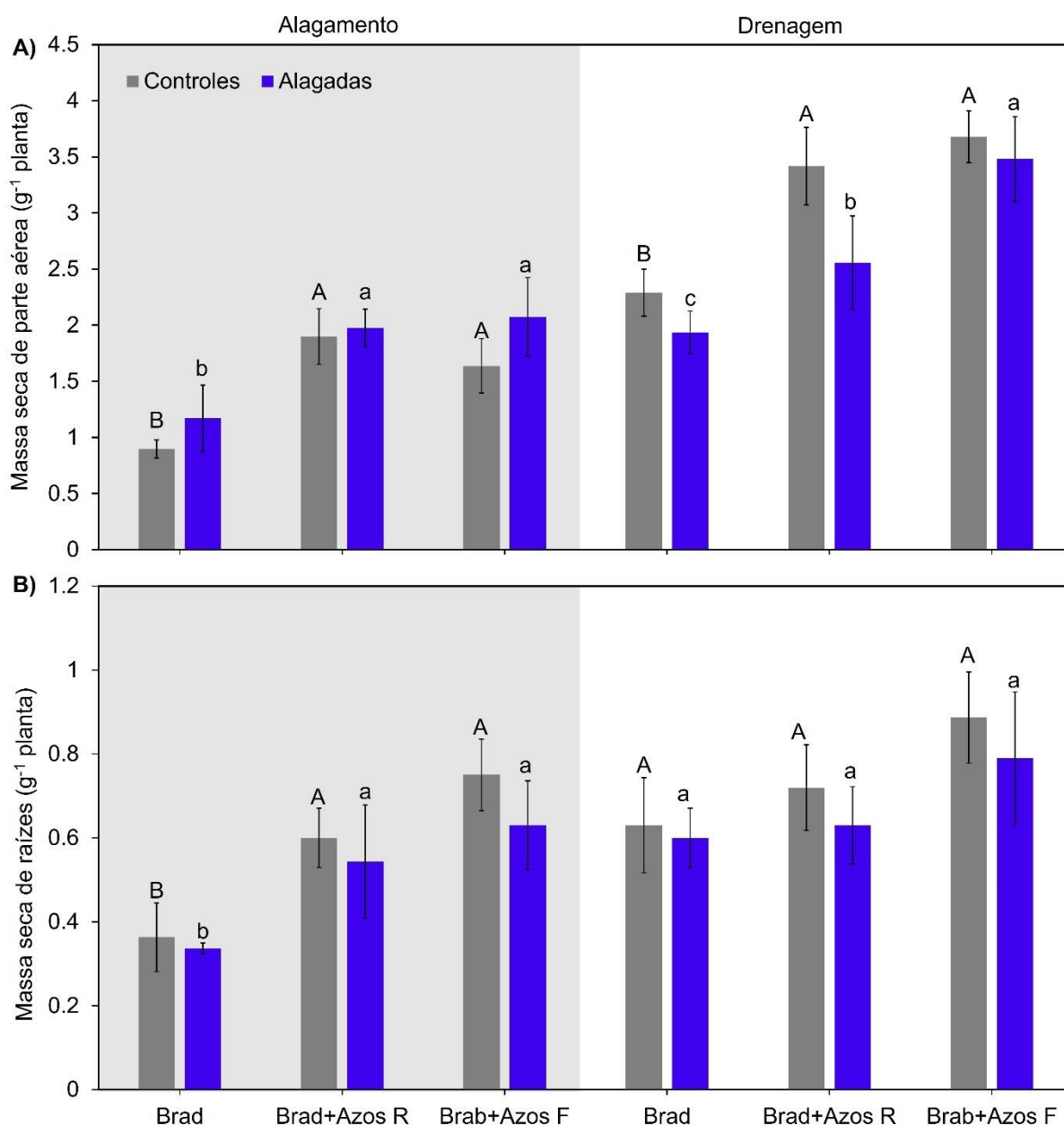


Figura 12: Acúmulo de massa seca em parte aérea (A) e massa seca em raízes (B) em plantas de soja cultivadas sob diferentes associações simbióticas e submetidas ao alagamento (sete dias) e posterior drenagem (quatro dias). Valores representam a média $\pm$ DP, n=4. Asteriscos indicam diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$). Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad- Inoculação *Bradyrhizobium*; Brad+AzosR- coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via sementes; Brad+AzosF – coinoculação *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* via parte aérea.

4. DISCUSSÃO

Durante o período de alagamento, as plantas podem reduzir drasticamente as trocas gasosas (A , g_s , E , C_i), entretanto para que isso ocorra alguns fatores como tempo de exposição ao estresse, cultivar, temperatura e luminosidade são pontos a serem levados em consideração (Garcia et al., 2020; Da-Silva e Amarante, 2020). Estes fatores são responsáveis por explicar por que não encontramos grandes diferenças entre plantas controles e alagadas, embora a maioria dos nossos experimentos caracterizam a redução das trocas gasosas foliares em plantas alagadas (Da-Silva et al., 2021) e a coinoculação atuando na mitigação destes efeitos (Shimoia et al., 2024). A técnica de coinoculação permitiu que as plantas apresentassem um melhor desempenho no que diz respeito as trocas gasosas em condições de controle, principalmente com uma melhor regulação da condutância estomática (g_s). As taxas de A maiores são sustentadas por maiores g_s atrelado a isso estão a E e C_i , sugerindo que os efeitos da coinoculação durante o período de alagamento é resultado de melhores trocas gasosas antes do evento de alagamento. O período de drenagem se apresentou como outro ponto de maior interferência da coinoculação permitindo melhores interações entre planta e microrganismo. Com a drenagem do sistema, as plantas melhoraram o desempenho das trocas gasosas na tentativa de superar o déficit ocasionado pelo período de alagamento. Resultados semelhantes, mostraram um aumento das trocas gasosas durante o período de drenagem, atrelado a modificações genéticas de NCED (de Oliveira et al., 2022). Aqui, esta resposta é explicada com taxas maiores de E , A e g_s em comparação com plantas controles, principalmente em plantas coinoculadas via parte aérea. Isso possivelmente ocorre devido à interação direta do microrganismo com o metabolismo da folha.

Em plantas com metabolismo do tipo C3 reduções nas trocas gasosas foliares estão diretamente relacionadas com aumentos no metabolismo fotorrespiratório (Bauwe et al., 2023). O aumento da atividade da enzima GO, em plantas alagadas juntamente com aumentos na atividade do complexo GS-GOGAT, caracteriza o aumento do processo fotorrespiratório. Em condições normais o processo fotorrespiratório desperdiça carbono e energia, entretanto em condições de alagamento este metabolismo é de suma importância para superar o estresse. A fotorrespiração durante o período de alagamento atua reduzindo o acúmulo de poder redutor gerado na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese e reciclando compostos nitrogenados reduzindo também o acúmulo de amônia. A dinâmica de aumentos da fotorrespiração na tentativa de aliviar estresses é documentada não só em plantas de soja, mas também em plantas de trigo (Wang et al., 2016; Mustafa et al., 2023). As diferenças entre

plantas coinoculadas com *Azospirillum* e somente inoculadas com *Bradyrhizobium* foram muito mais evidentes quando expomos as plantas a condições estressantes ou então quando a coinoculação foi realizada via parte aérea. Em ambas as situações as atividades da enzima GO e do complexo GS-GOGAT foram maiores em plantas somente inoculadas do que em plantas coinoculadas assim é nítida a influência da coinoculação sobre a redução da fotorrespiração, possivelmente devido a menor geração de glicolato e amônio nesses grupos de plantas. No período de drenagem, aumentaram as diferenças entre o grupo Brad e grupos dos tratamentos de coinoculação: níveis de atividade de GO e do complexo GS-GOGAT equiparados aos níveis do controle nas plantas coinoculadas, contrastantes às atividades do grupo Brad, que mantiveram atividades significativamente maiores ao controle e plantas coinoculadas sob drenagem, indicando maiores taxas fotorrespiratórias e menor capacidade de recuperação ao estresse por alagamento.

As melhores respostas do metabolismo fotorrespiratório não somente correspondem a melhores taxas fotossintéticas, mas também à manutenção e preservação dos pigmentos fotossintéticos. A concentração de pigmentos fotossintéticos costuma ser reduzida durante o alagamento, seja devido à ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas membranas dos cloroplastos ou à deficiência de nitrogênio resultante da diminuição da fixação, o que pode levar à remobilização de nitrogênio pela planta (Da-Silva et al., 2021). Reduções significativas no teor de clorofila total e carotenoides em plantas somente inoculadas ou coinoculadas via sementes podem ser explicadas por estes processos. Porém cabe ressaltar que plantas coinoculadas via parte aérea não reduziram o teor total de clorofilas e carotenoides durante o alagamento. Decréscimos na concentração de clorofilas refletem as tentativas da planta de lidar com o estresse, estando relacionado com melhor desempenho do metabolismo nitrogenado discutido anteriormente com o complexo GS-GOGAT. Em nosso estudo, as reduções mais acentuadas foram observadas durante o período de drenagem, possivelmente pelos mesmos fatores, como acúmulo de ROS e deficiência de nitrogênio, uma vez que, nesse período, as plantas ainda apresentavam altos níveis de estresse e a fixação provavelmente não havia retornado à sua plena atividade, observado pelas concentrações de ureídeos e de aminoácidos foliares, especialmente nas plantas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium*.

A dinâmica entre pigmentos e alagamento é influenciada pela coinoculação (Juge et al., 2012; Spagnoletti et al., 2020). Os pigmentos fotossintéticos e o metabolismo fotorrespiratório, desempenham um papel crucial na proteção das plantas contra danos oxidativos causados pelo excesso de radiação, especialmente durante o alagamento, quando a

eficiência fotossintética é reduzida. Além disso, em casos de senescência foliar e degradação de pigmentos, esses compostos podem ser utilizados como fonte de nutrientes para folhas jovens, especialmente o nitrogênio, considerando que a fixação está comprometida pelo alagamento (Liu et al., 2023).

Essa remobilização de nutrientes, durante ou após o estresse, pode ser uma estratégia para a planta superar as adversidades, especialmente se a coinoculação estiver potencializando essa remobilização de nitrogênio. Plantas coinoculadas têm demonstrado aumentar os níveis de pigmentos, mesmo sob déficit hídrico, mantendo melhores respostas fotossintéticas (Chieb et al., 2023). Segundo Tsavkelova et al. (2006) e Glick et al. (2012), a maior concentração de pigmentos em plantas coinoculadas com rizobactérias promotoras do crescimento (PGPB) é atribuída à modulação hormonal promovida pelos microrganismos, especialmente pelo ácido indolacético (AIA). A modulação dos fitormônios pelos microrganismos resulta em menores perdas de pigmentos fotossintéticos em condições de estresse.

O acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante o alagamento é resultado principalmente do mau funcionamento da cadeia transportadora de elétrons seja da fotossíntese ou das mitocôndrias. O principal resultado do acúmulo de H_2O_2 é a peroxidação de lipídeos (MDA), o que em folhas de plantas coinoculadas foi atenuado. Em raízes, mesmo com o acúmulo de H_2O_2 tendo sido menor durante o alagamento quando comparando com a parte aérea, ocorreu uma maior degradação de lipídeos. Isto ocorre porque durante o alagamento a planta está com todo seu metabolismo comprometido inclusive o de sinalização e síntese de proteínas com funções antioxidantes, proteínas que podem estar inclusive sendo degradadas. Já no período de drenagem houve um aumento no acúmulo de H_2O_2 no sistema radicular, provavelmente ligado à reentrada de O_2 no sistema. Então foi possível visualizar o efeito antioxidante promovido pela coinoculação, evitando a degradação de lipídeos. A redução do estresse oxidativo ocorreu por meio do aumento da atividade antioxidante, principalmente pelas enzimas CAT, SOD e APX. Na atividade da enzima SOD não houve grandes alterações entre as vias de coinoculação, porém as plantas coinoculadas apresentaram uma maior atividade. Já para CAT e APX em folhas foi possível observar uma maior atividade da CAT em folhas de plantas coinoculadas via sementes indicando que a resposta de plantas coinoculadas via parte aérea está mais vinculada a detoxificação das células por APX. As atividades das enzimas SOD, CAT e APX em raízes não apresentaram relação direta da coinoculação com órgão folha/raiz, apenas um aumento significativo da atividade enzimática principalmente no período de reoxigenação para evitar a degradação de lipídeos.

As melhores respostas de plantas coinoculadas frente ao estresse oxidativo, não estão somente ligadas ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes. O processo de detoxificação é bem mais complexo e pode estar relacionado com outras formas de mitigação de danos que resultam em um aumento da atividade antioxidante. A produção de NO e aumento de antioxidantes não enzimáticos são outras formas de defesa citadas na literatura (Da-silva e Amarante 2020; Creus et al., 2005; Fulkami et al., 2018; Posso et al., 2023)

Nem todos os estresses são capazes de expressar respostas em todos os módulos (órgãos), porém toda a resposta encontrada na parte aérea de plantas em condições de alagamento está diretamente relacionada com a privação inicial de O₂ nas raízes. Plantas são supridas energeticamente pela fotossíntese e respiração e, a redução do nível O₂ na mitocôndria, em função do alagamento do sistema radicular, compromete ambas as formas de produção de energia (Jethva et al., 2022). A superação do estresse causado pelo alagamento está relacionada com a ativação do metabolismo fermentativo, notoriamente ativado e principalmente em plantas coinoculadas. Isso ocorre devido ao acúmulo de intermediários do ciclo de Krebs, da glicólise e de poder redutor (Borella et al., 2017).

O aumento da atividade da enzima PDC, encontrado em plantas coinoculadas pode ser responsável por maiores taxas de redução de piruvato e aumento na produção energética a nível de substrato, favorecendo as plantas durante o alagamento através de fermentação. Os resultados apontam uma maior fermentação alcoólica ao invés da láctica. A maior atividade da enzima LDH em plantas coinoculadas possivelmente seja responsável pela maior atividade enzimática da ADH em comparação com plantas somente inoculadas, pois a fermentação alcoólica pode ter sido ativada pelo acúmulo de lactato, evitando assim acidose celular e produção contínua de ATP em nível de substrato. Alterações nos padrões de fermentação em condições de alagamento são alcançados com diferentes cultivares (Garcia et al., 2020), em que cultivares tolerantes tendem a ter uma maior fermentação láctica (Posso et al., 2025).

Plantas coinoculadas apresentam uma atividade maior da enzima LDH caracterizando alterações no padrão de atividade fermentativa encontrado na cultivar, a predominantemente tem maior atividade de ADH, apoiando o melhor desempenho de plantas coinoculadas frente ao alagamento. Bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de produzir óxido nítrico (NO) e disponibilizar para as plantas (Creus et al., 2005). Por sua vez plantas com maior atividade metabólica mediada por NO tem uma melhor resposta frente ao alagamento (Hartman et al., 2019; Da-Silva e Amarante 2020). Plantas coinoculadas apresentam uma drástica redução do metabolismo fermentativo no período de reoxigenação em comparação com plantas somente

inoculadas as quais ainda mantiveram uma maior atividade fermentativa mesmo com a drenagem do sistema radicular.

As plantas que apresentam uma regulação hormonal mais adequada detêm características fortes de tolerância, como um controle mais eficiente o metabolismo fermentativo, visto que este é desencadeado via sinalização hormonal. (Pan et al., 2021). As bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes não somente de produzir, mas também de auxiliar a planta em sua homeostase hormonal (Cassán et al., 2014; Zeffa et al., 2020). Dessa forma, as melhores respostas do metabolismo fermentativo de plantas coinoculadas no período de drenagem podem estar diretamente ligadas com a ação hormonal e do NO proveniente das bactérias coinoculadas, independentemente do órgão em que a coinoculação ocorreu. A atividade da enzima Ala-At apesar de ter sido aumentada durante o período de alagamento foi inversamente proporcional em relação às enzimas fermentativas. Sua atividade foi menor em plantas coinoculadas, indicando decréscimo do acúmulo de piruvato reduzido pelas outras enzimas.

Com o início do alagamento ocorre uma parada imediata da fixação de N₂ atmosférico realizado pelas bactérias do gênero *Bradyrhizobium* por diversas razões, dentre elas principalmente a baixa difusão dos gases em água e deficiência energética (Amarante et al., 2022; Da-Silva e Amarante 2020). É possível que ocorra uma redução dos níveis de aminoácidos (Aas) na planta, entretanto o mais comum é um acúmulo gerado pela parada do metabolismo em função da deficiência energética. Um menor acúmulo de Aas encontrado em folhas e raízes de plantas coinoculadas pode estar relacionado com uma maior atividade metabólica destas plantas visto que de forma geral ao considerarmos outros parâmetros, estas apresentam melhores respostas.

Em particular, as plantas coinoculadas via parte aérea são ainda mais eficientes na mobilização de Aas entre parte aérea e raízes. Isso está atrelado a remobilização metabólica de compostos carbônicos e nitrogenados entre parte aérea e raízes que alivia o estresse ocasionado pelo alagamento (Vitor e Sodek 2019). Somado a isso, as plantas coinoculadas apresentaram maiores concentrações de Aas em relação a plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*, caracterizando maior fixação de nitrogênio. Resultados semelhantes já foram descritos na bibliografia em que plantas coinoculadas com *Azospirillum* têm maior atividade do complexo GS-GOGAT em raízes e nódulos (Shimoia et al., 2023). O período de drenagem é caracterizado por uma redução da concentração de Aas em folhas, isto se explica pela grande necessidade de plantas drenadas retomarem à produção de proteínas e compostos

nitrogenados. Em raízes de forma geral isto não ocorreu possivelmente em função do metabolismo ser mais lento durante a reoxigenação.

Apesar da principal fonte de nitrogênio em plantas de soja associadas simbioticamente com *Bradyrhizobium* ser os Ureídeos (Ure), as respostas observadas nas concentrações dessas moléculas foram muito similares às encontradas para Aas, pois a síntese de ambos os grupos de moléculas nitrogenadas é interdependente (Amarante et al., 2022). Em folhas a diferença entre tratamentos para Ure não foi tão acentuada como foi para Aas. Isso pode estar relacionado à fixação de N₂ em função da coinoculação com *Azospirillum* sugerindo que existe uma compensação entre os dois grupos de moléculas nitrogenadas. Entretanto em raízes a diferença na concentração de Ure foi significativamente maior em plantas coinoculadas e isto está diretamente relacionado à coinoculação. Diversos trabalhos apontam que plantas coinoculadas tem uma maior fixação de N₂ justificada por nódulos maiores, mais numerosos e mais eficientes (Hungria et al., 2013; Etesami e Sina 2020; Moretti et al., 2020).

A retomada da fixação de N₂ não é algo tão rápido quanto sua parada com o início do alagamento, porém plantas coinoculadas apresentam uma retomada melhor frente a plantas somente inoculadas. Maiores atividades do sistema GS-GOGAT em raízes e nódulos de plantas coinoculadas em processo de drenagem corroboram estes resultados (Shimoia et al., 2023). Ainda, os dados obtidos reforçam a hipótese de que plantas coinoculadas via parte aérea tendem a mitigar mais o estresse do que plantas coinoculadas via sementes.

Mesmo com melhorias metabólicas em função da coinoculação é possível também perceber efeitos positivos nos parâmetros de crescimento das plantas. Plantas coinoculadas, independentemente do órgão, apresentaram melhores respostas biométricas, em relação ao acúmulo de massa seca de parte aérea e raízes frente a plantas somente inoculadas com *Bradyrhizobium*. As maiores diferenças da coinoculação são resultados anteriores ao período de alagamento, visto que durante o período de alagamento ocorre uma estagnação das plantas. O melhor desempenho biométrico em plantas coinoculadas é em função de maiores taxas fotossintéticas que produzem maiores quantidades de açúcares solúveis totais, capazes de serem convertidos em moléculas envolvidas na estrutura das plantas (Shimoia et al., 2024).

O efeito da coinoculação via parte aérea foi mais pronunciado no desenvolvimento da parte aérea no período de drenagem visto que durante o alagamento toda a planta está severamente comprometida. As plantas com maiores massas (reservas de carbono) apresentam maiores chances de sustentar um metabolismo fermentativo durante o alagamento, o que se relaciona às maiores respostas metabólicas das plantas coinoculadas frente ao alagamento.

Diversas alternativas para amenizar os efeitos do alagamento em plantas de soja tem sido estudada, desenvolvida ou mesmo utilizada, como a criação de cultivares mais tolerantes, nutrição com nitrato, *priming*, coinoculação com fungos, dentre outras. A coinoculação com *Azospirillum* é uma alternativa mostra ser uma ferramenta importante para mitigar os efeitos do estresse por alagamento em plantas de soja, seja ela feita via sementes ou via parte aérea. A coinoculação via parte aérea mostra-se eficiente na melhoria de diversos aspectos metabólicos, entretanto são necessários mais estudos para comprovação do método frente ao alagamento e também estudos relacionados à tecnologia de aplicação visto que a técnica envolve um bioinsumo bastante sensível às intempéries climáticas.

5. CONSIDERAÇÕES

A técnica de coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* é uma alternativa para atenuar os efeitos do alagamento tanto no metabolismo do carbono quanto do nitrogênio. A coinoculação via foliar é tão eficiente quanto à coinoculação via sementes. Nos aspectos estudados, podemos inferir que a coinoculação via folhas pode auxiliar melhor a planta durante o período de alagamento, frente ao estresse oxidativo, alterações nos metabolismos fotorrespiratório e fermentativo, além de promover uma melhor metabolização de compostos nitrogenados. As melhores respostas metabólicas aliadas com melhores respostas das trocas gasosas resultaram em um maior crescimento inicial das plantas, evidenciando que as melhores respostas de plantas de soja quando coinoculadas principalmente via foliar está ligada a múltiplos processos fisiológicos.

6. REFERÊNCIAS

- Agualongo, D. A. P., Da-Silva, C. J., Garcia, N., de Oliveira, F. K., Shimoia, E. P., Posso, D. A., do Amarante, L. (2022). Waterlogging priming alleviates the oxidative damage, carbohydrate consumption, and yield loss in soybean (*Glycine max*) plants exposed to waterlogging. *Functional Plant Biology*, 49(12), 1029-1042. <https://doi.org/10.1071/FP22030>
- Aranjuelo, I., Arrese-Igor, C., & Molero, G. (2014). Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of plant physiology*, 171(12), 1076-1090. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.002>
- Armstrong W, Strange ME, Cringle S, Beckett PM (1994) Microelectrode and modeling study of oxygen distribution in roots. *Annals of Botany* 74: 287-299

Azevedo, R. A.; Alas, R.M.; Smith, R.J.; Lea, P.J. (1998). Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, v. 66 104, n. 2, p. 280–292. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217>.

Bai YR, Yang P, Su YY, He ZL, Ti XN (2014) Effect of exogenous methanol on glycolate oxidase and photorespiratory intermediates in cotton. *J Exp Bot* 65:5331–5338. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru294>

Barbosa, J. Z., Hungria, M., da Silva Sena, J. V., Poggere, G., dos Reis, A. R., & Corrêa, R. S. (2021). Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. *Applied Soil Ecology*, 163, 103913. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>

Bauwe, H. (2023). Photorespiration Rubisco's repair crew. *Journal of Plant Physiology*, 280, 153899. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153899>

Bielecki RL, Turner NA (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* 17, 278–293. doi:10.1016/ 0003-2697(66)90206-5

Borella, J., Oliveira, H. C., de Oliveira, D. D. S. C., Braga, E. J. B., de Oliveira, A. C. B., Sodek, L., & do Amarante, L. (2017). Hypoxia-driven changes in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolites of two nodulated soybean genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 133, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.007>

Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83, 463–468. doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x

Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33, 440–459 (2014). 647 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>

Chieb, M., Gachomo, E.W. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biol* 23, 407 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>

Chieb, M., Gachomo, EW O papel das rizobactérias promotoras do crescimento das plantas nas respostas ao estresse hídrico das plantas. *BMC Planta Biol* 23 , 407 654 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>

Creus, C. M., Graziano, M., Casanovas, E. M., Pereyra, M. A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2005). Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta*, 221, 297-303. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1523-7>

Cullimore, J.V.;Lara, M.; Lea, P.J.; Miflin, B.J. (1982). Multiple forms of glutamine synthetase in plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Israel Journal Botany*. 31: 155-914 162.

Da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020). Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104242. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104242>

Da-Silva, C. J., & do Amarante, L. (2020). Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104242. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104242>

Da-Silva, C. J., Shimoia, E. P., Posso, D. A., Cardoso, A. A., Batz, T. A., Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2021). Nitrate nutrition increases foliar levels of nitric oxide and waterlogging tolerance in soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03291-5>

de Oliveira, F. K., Da-Silva, C. J., Garcia, N., Agualongo, D. A. P., de Oliveira, A. C. B., Kanamori, N., ... & do Amarante, L. (2022). The overexpression of NCED results in waterlogging sensitivity in soybean. *Plant Stress*, 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100047>

Etesami, H., Adl, S.M. (2020). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Action Mechanisms in Availability of Nutrients to Plants. In: Kumar, M., Kumar, V., Prasad, R. (eds) *Phyto-Microbiome in Stress Regulation*. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_9

Etesami, H; Adl; S. M. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. In *Phyto-Microbiome in Stress Regulation* (pp. 147-203). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_9

Fehr; Caviness, (1977) W.R; *Stages of Soybean Development* Iowa State University, Ames, IA .

Filipini, L. D., Pilatti, F. K., Meyer, E., Ventura, B. S., Lourenzi, C. R., & Lovato, P. E. (2021). Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Archives of Microbiology*, 203, 1033-1038. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M. (2018a). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr* 8, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

Fukami, J., Ollero, F. J., de la Osa, C., Valderrama-Fernandez, R., Nogueira, M. A., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of microbiology*, 200, 1191-1203. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>

Fukami, J., Ollero, F. J., de la Osa, C., Valderrama-Fernandez, R., Nogueira, M. A., Megías, M., Hungria, M. (2018b). Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of microbiology*, 200, 1191-1203. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>

Garcia, N., da-Silva, C. J., Cocco, K. L. T., Pomagualli, D., de Oliveira, F. K., da Silva, J. V. L., do Amarante, L. (2020). Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through different physiological and biochemical mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 172, 103975. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.103975>

Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, v. 59, n. 2, p. 309–14. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

Gilbert, S., Poulev, A., Chrisler, W., Acosta, K., Orr, G., Lebeis, S., & Lam, E. (2022). Auxin-producing bacteria from duckweeds have different colonization patterns and effects on plant morphology. *Plants*, 11(6), 721. <https://doi.org/10.3390/plants11060721>

Glick, B. R. (2012). Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Good, A. G. & Muench, D. G. (1992). Purification and Characterization of an Anaerobically Induced Alanine Aminotransferase from Barley Roots. *Plant Physiology*, v. 99, n. 4, p. 1520–1525, 1 ago.64 <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1520>

Hanson, A. D.; Jacobsen, J. V; Zwar, J. A. (1984) Regulated Expression of Three Alcohol Dehydrogenase Genes in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiology*, v. 75, n. 3, p. 573–581, 1 jul. <https://doi.org/10.1104/pp.75.3.573>

Hartman, S., Liu, Z., van Veen, H. et al. Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nat Commun* 10, 4020 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12045-4>

Hausler, R. E., Blackwell, R. D., Lea, P. J., Leegood, R. C. (1994). Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. I. Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids. *Planta*, 194(3):406-417. <https://doi.org/10.1007/BF00197542>

Hungria, M; Nogueira, M. A; Araujo, R.S. (2013). Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 33., 2013, Londrina. Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa.

Jethva, J., Schmidt, R. R., Sauter, M., & Selinski, J. (2022). Try or die: Dynamics of plant respiration and how to survive low oxygen conditions. *Plants*, 11(2), 205. <https://doi.org/10.3390/plants11020205>

Juge, C., Prévost, D., Bertrand, A., Bipfubusa, M., & Chalifour, F. P. (2012). Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Applied Soil Ecology*, 61, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.05.006>

Justino, G. C., & Sodek, L. (2013). Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulated root system of soybean. *Journal of Plant Physiology*, 170(3), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.006>

Khan, N., Bano, A., Ali, S., & Babar, M. A. (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 90, 189-203. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00571-x>

Kim, K. H., Cho, M. J., Kim, J. M., Lee, T., Heo, J. H., Jeong, J. Y., Kang, S. (2019). Growth response and developing simple test method for waterlogging stress tolerance in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 22, 371-378. <https://doi.org/10.1007/s12892-019-0271-0>

Liu Y, Gao S, Hu Y, Zhang T, Guo J, Shi L, Li M. 2023. Comparative study of leaf nutrient reabsorption by two different ecotypes of wild soybean under low nitrogen stress. *PeerJ* 11:e15486 <https://doi.org/10.7717/peerj.15486>

Marino, D., Cañas, R. A., & Betti, M. (2022). Is plastidic glutamine synthetase essential for C3 plants? A tale of photorespiratory mutants, ammonium tolerance and conifers. *New Phytologist*, 234(5), 1559-1565. <https://doi.org/10.1111/nph.18090>

MORETTI, L.G; CRUSCIOL, C.A.C; BOSSOLANI, J.W; MOMESSO, L; GARCIA, A.; KURAMAE, E.E; HUNGRIA M, (2020). M. Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>.

Mustafa, G., & Komatsu, S. (2023). Proteomics: Aim at Stress Mitigation in Soybean under Flooding. *Climate Change and Legumes: Stress Mitigation for Sustainability and Food Security*. <https://doi/10.1201/9781003214885-5>

Nakano, Y. & Asada, K. Hydrogen. (1981). Peroxide is Scavenged by Ascorbate specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v. 22, n. May, p. 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

Pan, J., Sharif, R., Xu, X., & Chen, X. (2021). Mechanisms of waterlogging tolerance in plants: Research progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 11, 627331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.627331>

Ploschuk, R.A., Miralles, D.J. & Striker, G.G. (2022). A quantitative review of soybean responses to waterlogging: agronomical, morpho-physiological and anatomical traits of tolerance. *Plant Soil* 475, 237–252. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05364-x>

Portugal JR, Arf O, Peres AR, Gitti DC, Rodrigues RAF, Garcia NFS, Garé LM (2016) *Azospirillum brasilense* promotes incremente in corn production. *Afr J Agric Res* 11:1688–1698. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10723>

Posso, D. A., Shimoia, E. P., da-Silva, C. J., Phan, A. N. T., Reissig, G. N., da Silva Martins, T., ... & do Amarante, L. (2025). Soybean tolerance to waterlogging is achieved by detoxifying root lactate via lactate dehydrogenase in leaves and metabolizing malate and succinate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 220, 109520. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109520>

Puente ML, Gualpa JL, Molina LGA, RM, Carletti SM, Cassán FD, (2018) The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. *Symbiosis* 76:41–49. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>

Puente ML, Zawoznik M, Sabando ML, Perez G, Gualpa JL, Carletti SM, Cassán FD (2019) Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. *Symbiosis* 77:41–47. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0568-x>

Puente, M. L., Maroniche, G. A., Panepucci, M., Sabio y Garcia, J., García, J. E., Criado, M. V., Cassán, F. (2021). Localization and survival of *Azospirillum brasilense* Az39 in soybean leaves. *Letters in Applied Microbiology*, 72(5), 626-633. <https://doi.org/10.1111/lam.13444>

Ramirez-Mata, A., Pacheco, M. R., Moreno, S. J., Xiqui-Vazquez, M. L., & Baca, B. E. (2018). Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. *Microbiological research*, 215, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.007>

Ramírez-Ordorica, A., Valencia-Cantero, E., Flores-Cortez, I., Carrillo-Rayas, M. T., Elizarraraz-Anaya, M. I. C., Montero-Vargas, J., Macías-Rodríguez, L. (2020). Metabolomic effects of the colonization of *Medicago truncatula* by the facultative endophyte *Arthrobacter agilis* UMCV2 in a foliar inoculation system. *Scientific reports*, 10(1), 8426. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65314-4>

Rhodes, D., & Nadolska Orczyk, A. (2001). Plant stress physiology. e LS. DOI 1490 10.1038/npg.els.0001297

Ribas, G. G., Zanon, A. J., Streck, N. A., Pilecco, I. B., de Souza, P. M., Heinemann, A. B., & Grassini, P. (2021). Assessing yield and economic impact of introducing soybean to the lowland rice system in southern Brazil. *Agricultural Systems*, 188, 103036. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.103036>

Shimoia, E. P., Da-Silva, C. J., Posso, D. A., da Silva Martins, T., Agualongo, D. A. P., de Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Co-inoculation of seeds with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and *Rhizophagus* improves nitrogen assimilation and growth in soybean plants subjected to waterlogging. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 146. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601040>

Shimoia, E.P.; Posso, D.A.; da-Silva, C.J.; Bester, A.U.; Bernardi, N.D.C.; Carvalho, I.R.; de Oliveira, A.C.B.; Avila, L.A.d.; do Amarante, L. Co-Inoculation of soybean seeds with *Azospirillum* and/or *Rhizophagus* mitigates the deleterious effects of waterlogging in plants under enhanced CO₂ concentrations. *Nitrogen* 2024, 5, 941–976. <https://doi.org/10.3390/nitrogen5040061>

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina / Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. - 10. ed. – Porto Alegre, 2004. 400 p. : il. 1. Solo : Adubação : Calagem : Fertilidade : Rio Grande do Sul : Santa Catarina. I. Título.

Spagnoletti, F.N., Cornero, M., Chiocchio, V. et al. (2020). Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. *Eur J Plant Pathol* 156, 839–849. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01934-w>

Syvash, O. O., & Zolotareva, O. K. (2017). Regulation of chlorophyll degradation in plant tissues. *Biotechnologia Acta*, 10(3), 20-30. <https://doi.org/10.15407/biotech10.03.020>

Tien TM, Gaskins MH, Hubbell D (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. <https://doi.org/10.1128/AEM.37.5.1016-1024.1979>

Toru Matoh, Eiichi Takahashi, Shoji Ida, Glutamate synthase in developing pea cotyledons: Occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes, *Plant and Cell Physiology*, Volume 20, Issue 7, November 1979, Pages 1455–1459, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075947>

Tsavkelova, EA, Klimova, SY, Cherdyntseva, TA et al. (Produtores microbianos de estimuladores de crescimento de plantas e seu uso prático: uma revisão. *Appl Biochem Microbiol* 42, 117–126 <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>

Velikova, V.; Yordanov, I.; Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines, *Plant Science*, v. 151, i. 1, p.59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1).

Vitor, S. C., & Sodek, L. (2019). Products of anaerobic metabolism in waterlogged roots of soybean are exported in the xylem. *Plant science*, 284, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.023>

VOGELS, G.D; VAN DER DRIFT, C. (1970). Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*. v. 33, p. 143-157.

Wang, X., Huang, M., Zhou, Q., Cai, J., Dai, T., Cao, W., & Jiang, D. (2016). Mecanismos fisiológicos e proteômicos de priming de alagamento melhoram a tolerância ao estresse de alagamento no trigo (*Triticum aestivum* L.). *Botânica Ambiental e Experimental*, 132, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.003>

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology*, v. 144, p. 307-313.

YEMM, E.M; COCKING, E.C. (1955). Estimation of amino acids by ninhidrin. *The Analyst*, v. 80, p. 209-213.

Zeffa DM, Fantin LH, Koltun A, de Oliveira ALM, Nunes MPBA, Canteri MG, Gonçalves LSA. (2020). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ* 10158:e7905 <https://doi.org/10.7717/peerj.7905>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que a coinoculação de plantas de soja, independentemente do cultivo em ambientes com elevado CO₂, promove melhorias significativas nos metabolismos do carbono e do nitrogênio. O sinergismo destes fatores contribuem metabólicamente para uma maior tolerância das plantas frente ao estresse por alagamento. Ficou evidenciado nos resultados o potencial da técnica de coinoculação como sendo uma estratégia no manejo e na sustentabilidade da cultura da soja em cenários futuros de mudanças climáticas. A coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, especialmente quando realizada via parte aérea, favorece a atuação dos microrganismos em condições de alagamento, contribuindo para a modulação das enzimas associadas aos processos fermentativo, fotorrespiratório e nitrogenado. Essa resposta bioquímica mais eficiente nas plantas de soja sugere que a via de inoculação foliar pode representar uma estratégia promissora para mitigar os efeitos deletérios do estresse, promovendo maior adaptação e desempenho fisiológico da cultura em ambientes sujeitos a alagamentos.