



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA COM ÊNFASE EM AGROECOLOGIA

NATANAEL GRISA

DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE
***Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA**

LARANJEIRAS DO SUL

2020

NATANAEL GRISA

**DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE
Bradyrhizobium japonicum E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA**

Trabalho de conclusão do Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do grau
de Bacharel em Agronomia da Universidade
Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Grillo

LARANJEIRAS DO SUL

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Grisa, Natanael
DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE
Bradyrhizobium japonicum E Azospirillum brasilense NA
CULTURA DA SOJA EM CAMPO BONITO - PR / Natanael Grisa.
-- 2020.
24 f.:il.

Orientador: Doutor José Francisco Grillo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2020.

1. Inoculação. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3.
Bactérias diazotróficas. 4. Rhizobacterias. I. Grillo,
José Francisco, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NATANAEL GRISA

**DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO DE
Bradyrhizobium japonicum E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA
EM CAMPO BONITO - PR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul (PR)

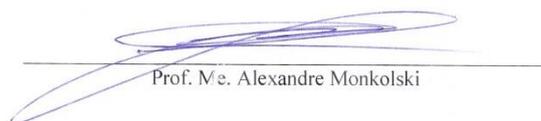
Orientador: Prof. Dr. José Francisco Grillo

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 10/12/2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Francisco Grillo


Engenheiro Agrônomo Luiz Gustavo Cardozo de Oliveira


Prof. M.e. Alexandre Monkolski

Em função da Pandemia do Coronavírus e as medidas de afastamento tomadas pela UFFS, esta Ata foi assinada pelo Presidente da Banca, como representante dos demais membros.”

RESUMO

A soja é a leguminosa mais produzida e consumida no mundo e o nutriente com maior importância para o seu máximo desenvolvimento vegetativo e produtivo e o nitrogênio, por ser um nutriente muito caro para se aplicar na forma de fertilizante químico, além de ter baixa efetividade e causar poluição, a melhor solução encontrada para suprir essa demanda é com a fixação biológica de nitrogênio (FBN), e essa fixação é maximizada pela inoculação de bactérias simbióticas e associativas na semente da cultura. A inoculação consiste em tratar as sementes da cultura ou aplicar por pulverização inoculantes em diferentes estádios vegetativos. Este trabalho teve por objetivo avaliar e comparar o desenvolvimento vegetal e a produção da cultura *Glicyne max*, em relação a diferentes formas de inoculação e coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. Essas bactérias têm como principal função fazer a fixação biológica de Nitrogênio (FBN) no solo para o uso das plantas. A metodologia do trabalho foi comparar a forma atual de inoculação dessas bactérias, que é feita na semente pré-plantio, com a inoculação das bactérias por pulverização em outros estádios vegetativos da planta (V2 e V6). Também foi realizada a coinoculação, ou seja, inoculando as duas bactérias de uma vez. O trabalho foi desenvolvido com 12 tratamentos e 3 repetições, totalizando 36 parcelas, sendo considerado Testemunha o tratamento já utilizado pelos agricultores, e foi feito em delineamento em blocos casualizado, implantado parcelas de 5m x 2,5m e tendo uma área útil para avaliação de 3m x 1,5m. Foram utilizados inoculantes na forma líquida com concentração de $1,1 \times 10^9$ UFC/ml tanto para *Bradyrhizobium japonicum* quanto para *Azospirillum brasilense*, para semeadura de 5 linhas com espaçamento de 50 cm entre linhas e 10 cm entre plantas. As variáveis analisadas foram nível de clorofila (g), altura de planta (cm), massa seca da parte aérea (g), número de vagens por planta, produtividade (kg ha^{-1}) e peso de mil grãos (g). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade, demonstraram que os tratamentos testados não influenciaram significativamente as variáveis consideradas, concluindo-se desta forma que em relação à forma de inoculação e coinoculação de bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, não há interferência direta nas variáveis analisadas, em uma área já cultivada com soja.

Palavras-chave: Inoculante. Rizobactéria. Bactéria Diazotrófica. Nitrogênio. Fixação Biológica.

ABSTRACT

Soy is the most produced and consumed legume in the world and the most important nutrient for its maximum vegetative and productive development and nitrogen, as it is a very expensive nutrient to be applied in the form of chemical fertilizer, besides having low effectiveness and cause pollution, the best solution found to supply this demand is with biological nitrogen fixation (FBN), and this fixation is maximized by the inoculation of symbiotic and associative bacteria in the seed of the crop. Inoculation consists of treating the crop's seeds or spraying inoculants at different vegetative stages. This work aimed to evaluate and compare the plant development and the production of the *Glycine max* culture, in relation to different forms of inoculation and coinoculation of the bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. These bacteria have the main function of making biological nitrogen fixation (BNF) in the soil for the use of plants. The methodology of the work was to compare the current form of inoculation of these bacteria, which is done in the pre-planting seed, with the inoculation of the bacteria by spraying on other vegetative stages of the plant (V2 and V6). Coinoculation was also performed, that is, inoculating the two bacteria at once. The work was developed with 12 treatments and 3 repetitions, totaling 36 plots, being considered Witness the treatment already used by the farmers, and was done in a randomized block design, implanted 5m x 2.5m plots and having a useful area for evaluation of 3m x 1.5m. Inoculants were used in liquid form with a concentration of 1.1×10^9 CFU/ml for both *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, for sowing 5 rows with 50 cm spacing between rows and 10 cm between plants. The variables analyzed were chlorophyll level (g), plant height (cm), shoot dry mass (g), number of pods per plant, productivity (kg ha⁻¹) and weight of a thousand grains (g). The data obtained were subjected to analysis of variance and Tukey's test at 5% probability, showing that the tested treatments did not significantly influence the variables considered, thus concluding that in relation to the form of inoculation and co-inoculation of bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, there is no direct interference in the variables analyzed, in an area already cultivated with soy.

Keywords: Inoculant. Rhizobacteria. Diazotrophic bacteria. Nitrogen. Biological Fixation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. DESENVOLVIMENTO.....	8
3. JUSTIFICATIVA.....	8
4. OBJETIVO GERAL.....	8
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
6. REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
6.1. Bactérias simbióticas com a soja.....	8
6.2. Bactérias diazotróficas.....	9
6.3. Formas de inoculação.....	9
6.3.1. Inoculação nas sementes.....	10
6.3.2. Inoculação via foliar.....	10
6.3.3. Coinoculação.....	11
6.4. Fixação do nitrogênio no nódulo.....	11
7. MATERIAL E METODOS.....	12
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
9. CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

A soja é a principal oleaginosa produzida e consumida no mundo. Sua importância reside no fato de, ao ser triturada, resultar em farelo e óleo. O primeiro subproduto, por ser rico em proteína, é destinado principalmente ao consumo animal, através de rações elaboradas. O segundo subproduto se destina especialmente ao consumo humano (BRUM, 2000).

Segundo Kurihara (2013), o teor elevado de proteína dos grãos de soja (*Glycine max*) cerca de 37%, resulta em uma demanda de nitrogênio (N) de 103 kg de N para a produção de 1.000 kg de grãos.

O método mais tradicional para se fixar N no solo para a absorção das plantas em cultivo é através da aplicação de N químico, que fica disponível rapidamente para a planta após sua aplicação, porém, tem um alto custo e necessita de um bom manejo para que não cause problemas como poluição ambiental, pois, a lixiviação e o escoamento causa o acúmulo desse nutriente em outras formas normalmente o nitrato, que é tóxico para peixes e seres humanos, também ocorre as trocas gasosas desses fertilizantes com o ar liberando N_2O que é um gás tóxico e que contribui para o crescimento do buraco na camada de ozônio (HUNGRIA, 2007).

A forma mais barata de utilização de nitrogênio na soja é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) que pode ser responsável por mais de 80% do nitrogênio acumulado pela planta. Nas leguminosas, o nitrogênio é absorvido na forma de N_2 e transformado em NH_4^+ através do processo simbiótico com bactérias (GERAHTY et al., 1992).

O processo de fixação biológica de Nitrogênio é maximizado pelo processo de inoculação de *Bradyrhizobium japonicum*, se tornando uma prática indispensável no cultivo da soja. A eficiência desses microrganismos tem possibilitado a obtenção de altos rendimentos de grãos da cultura, sem a necessidade de aplicação de nitrogênio mineral (HUNGRIA, 2001).

A inoculação se tornou uma prática essencial no cultivo da soja, mas muitas vezes ocorrem casos de falha na nodulação das plantas na lavoura, especialmente em áreas de primeiro cultivo de soja por que são áreas que nunca foi utilizado a bactéria *Bradyrhizobium* e por ter uma maior concorrência com outros microrganismos do solo. Outros fatores são o solo descoberto e as grandes temperaturas no solo, prejudicando a sobrevivência dos rizóbios e a infecção das raízes e, com isso, comprometendo o rendimento dos grãos (SILVA, 2019).

Visando diminuir esses problemas, novas formas de inoculação tem sido testadas, dentre elas, a inoculação no sulco de semeadura e a inoculação via foliar, que é uma técnica nova, ainda em pesquisa, mas que vem mostrando respostas significativas. Embora não seja muito utilizada, é de grande interesse, pois não se tem a morte de

bactérias por fungicidas e se pode aplicar o inoculante em diferentes estados fenológicos da soja (SILVA, 2019).

2. DESENVOLVIMENTO

3. JUSTIFICATIVA

Devido a demanda grande do nutriente Nitrogênio pelas plantas e ao seu alto custo de produção, a forma mais barata de obtê-lo é pela fixação biológica, que ocorre pela associação das bactérias diazotróficas e *Rhizobium*, que capturam o nutriente do ar atmosférico e fixam no solo. Essas bactérias entram na raiz da planta e formam nódulos e, por elas, a planta captura e utiliza esse N fixado. Elas são colocadas no solo através da inoculação de suas sementes em soluções contendo as bactérias, porém, esse tipo de inoculação pode apresentar problemas, como não ser bem distribuído nas sementes e não ter um solo com umidade adequada na época da semeadura.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento vegetal e a produção da cultura *Glycyne max*, em função de diferentes formas de inoculação e coinoculação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a altura de planta (cm), comparar o nível de clorofila (g), determinar a massa seca da parte aérea (g), verificar número de vagens por planta, estabelecer o peso de mil grãos (g) e definir a produtividade kg ha⁻¹ (área útil).

6. REFERENCIAL TEÓRICO

6.1. Bactérias simbióticas com a soja

A simbiose é restrita às leguminosas e se caracteriza pela formação de estruturas especializadas nas raízes, chamadas nódulos, nos quais ocorre o processo de FBN. Após a formação de nódulos nas raízes, a bactéria passa a fixar o nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos que são utilizados pelas plantas, eliminando ou diminuindo a necessidade de uso de adubos nitrogenados (MENDES, 2010).

As bactérias que formam nódulos nas raízes da soja eram classificadas, até alguns anos atrás, na espécie *Rhizobium japonicum*. Com os avanços nos estudos de taxonomia das bactérias foram detectadas grandes diferenças, particularmente genéticas, entre as

estirpes dessas bactérias (equivalente a cultivares de plantas ou raças de patógenos), resultando na reclassificação em duas novas espécies, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. Em linguagem popular, essas bactérias são, muitas vezes, denominadas somente de rizóbio ou bradirrizóbio (HUNGRIA, 2001).

6.2. Bactérias Diazotróficas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989).

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCP de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da terra. Há relatos, também, de que as bactérias desse gênero podem ser endofíticas facultativas, ou seja, que além de sobreviver de forma livre ainda podem colonizar hospedeiros (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; HUERGO et al., 2008).

Ao contrário das bactérias simbióticas (*Bradyrhizobium*), bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada. Posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011).

6.3. Formas de Inoculação

Os tipos de inoculantes comercializados atualmente no Brasil são os turfosos e os líquidos. Essas ou outras formulações devem ter comprovada eficiência agrônômica, conforme normas oficiais da RELARE aprovadas pelo MAPA. A inoculação deve ser feita à sombra e deve-se efetuar a semeadura no mesmo dia, especialmente se a semente estiver tratada com fungicida e micronutrientes, devendo mantê-la inoculada protegida do sol e do calor excessivo (SILVA, 2019).

Deve-se evitar o aquecimento em demasia do depósito da semente na semeadora, pois altas temperaturas reduzem o número de bactérias viáveis aderidas à semente. Para melhor aderência dos inoculantes turfosos, recomenda-se umedecer a semente com 300 ml/50 kg semente de água açucarada a 10% (100 g de açúcar e completar para um litro de água). É imprescindível que a distribuição do inoculante turfoso ou líquido seja uniforme em todas as sementes para que se tenha o benefício da FBN em todas as plantas (CAMPOS & HUNGRIA, 2001).

6.3.1. Inoculação nas Sementes

Se o inoculante utilizado for do tipo turfoso, as sementes devem ser umedecidas com uma solução açucarada ou outra substância adesiva. Deve-se adicionar o inoculante, homogeneizar e deixar secar a sombra. A distribuição da mistura açucarada/adesiva mais inoculante nas sementes deve ser feita, preferencialmente, em máquinas próprias, tambor giratório ou betoneira. Mas, se o inoculante utilizado for do tipo líquido, é necessário apenas aplicar o inoculante nas sementes, homogeneizar e deixar secar a sombra, sem a necessidade de utilização de uma substância adesiva. E também não se pode deixar a semente inoculada por muito tempo para ser utilizada, se não o mesmo perde a eficiência, e não devendo haver exposição ao sol (ZILLI et al., 2009).

De acordo com Zilli et al. (2010), avaliações realizadas em diversos experimentos no Brasil, durante três anos consecutivos, indicaram ser possível a inoculação antecipada das sementes da soja em até cinco dias antes da semeadura, o que possibilitaria ao produtor realizar a inoculação previamente à semeadura e executá-la no momento oportuno.

6.3.2. Inoculação via foliar

Constatada a falha na nodulação da lavoura, o produtor necessita adotar estratégias de forma a contornar o problema. Na maioria das vezes, utiliza-se a adubação nitrogenada mineral a qual eleva o custo de produção (HUNGRIA et al., 2005). Em outros casos, entretanto, são realizadas aplicações de inoculantes diluídos em água, em cobertura da lavoura, o que tem mostrado respostas positivas. Um trabalho conduzido na Tailândia, na década de 80 do século passado, com um método de inoculação em pós emergência na linha de plantio de soja, mostrou que a aplicação de inoculante na proporção de 106 células bacterianas por plântula, até 15 dias após o plantio, proporcionou nodulação, massa de matéria seca das plantas e rendimento de grãos significativamente iguais aos proporcionados pela inoculação no plantio (BOONKERD et al., 1985). Também foi observado neste trabalho que a eficiência da inoculação em pós-emergência é grandemente afetada pela umidade do solo (ZILLI, 2008).

O manejo inadequado do inoculante, seja este no momento do transporte, na forma de armazenamento, do tempo de inoculação antes da semeadura, e mesmo na forma de inocular, produz redução do número de células viáveis de *Bradyrhizobium* (PANIAGUA, 2017).

Visando paliar esse problema, busca-se a complementação através de aumento das doses, ou de aplicações no sulco de semeadura e inclusive aplicações foliares, para manter o número de células viáveis de *Bradyrhizobium*, pois quanto maior for o número de células viáveis, maior será a possibilidade de alta nodulação e,

consequentemente, o suprimento de nitrogênio às plantas (HUNGRÍA et al, 2006).

6.3.3. Coinoculação

A coinoculação consiste em utilizar uma combinação de diferentes microrganismos inoculadores, com a finalidade de superar os resultados obtidos com o uso de apenas um inoculante. A coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense* tem como objetivo aproveitar ao máximo as características de ambos os microrganismos. Os fitormônios produzidos pelo *A. brasilense* geram um maior desenvolvimento radicular, que por sua vez resulta em maior nodulação por meio do *B. japonicum*, gerando consequentemente uma maior fixação biológica do nitrogênio. Além de que, um maior sistema radicular promove um maior aproveitamento dos nutrientes e água disponível do solo, gerando uma menor susceptibilidade à estresses hídricos (HUNGRIA, 2014).

6.4. Fixação do Nitrogênio no Nódulo

Na fixação biológica, o N_2 é transformado em NH_3 à custa de energia da planta. O complexo enzima nitrogenase, formado por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), são responsáveis pela fixação de nitrogênio no nódulo (TAÍZ & ZIEGER, 2004).

O Níquel (Ni) exerce influência direta no processo de (FBN), pois é constituinte da enzima hidrogenase (KLUCAS, 1983). O transporte do nitrogênio (N) advindo da FBN é realizado por ureídeos, que são compostos do metabolismo secundário das plantas, os quais catalisam, no final do transporte, a molécula da ureia, que é metabolizada posteriormente pela enzima uréase, da qual o Ni faz parte do grupo prostético (McCLURE, 1979).

A fixação biológica de nitrogênio depende do estabelecimento de condições anaeróbias para a ativação da enzima nitrogenase. Os nódulos possuem uma heme proteína chamada de leghemoglobina que se liga ao oxigênio e que está presente em altas concentrações nos nódulos. A planta produz a porção globina em resposta à infecção da bactéria, tendo esta proteína uma alta afinidade por O_2 . Tanto a leghemoglobina como a barreira de difusão de oxigênio no nódulo são reguladores importantes na tensão de oxigênio no nódulo, protegendo o complexo enzima nitrogenase que é irreversivelmente inativado pelo oxigênio (FAGAN et al, 2007).

Dentre os fatores ambientais mais importantes para o processo de fixação biológica de nitrogênio, a ocorrência de deficiências hídricas, ou seja, seca durante o ciclo de cultivo tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de nodulação e na atividade nodular, além de afetar a sobrevivência do rizóbio no solo. A ocorrência de altas temperaturas afeta, também, a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, a formação dos nódulos e ainda a atividade de FBN (FERREIRA, 2003).

6. MATERIAL E METODOS

Este trabalho foi desenvolvido na safra 2019/2020, na região oeste do Paraná, no município de Campo Bonito, que localiza-se na coordenadas de latitude 25° 01' 52" S e longitude 52° 59' 33" W, com altitude de 720m, o solo classificado como Latossolo Vermelho de textura argilosa.

O experimento foi conduzido numa área com histórico de 10 anos de produção de soja em rotatividade com outras culturas como feijão, trigo e azevém (Tabela 1). O delineamento amostral foi efetuado em blocos casualizados. Esta área foi escolhida para se obter resultados reais de diferentes formas de inoculação e coinoculação em função da mesma possuir um histórico de cultivo de soja pelo proprietário.

Tabela 1. Histórico de produção da área do experimento nos últimos 10 anos em função de diferentes rotações de cultura.

Ano	Safra de verão	Safrinha	Safra de inverno
2010	Soja	Feijão	Trigo
2011	Feijão	Milho	-
2012	Soja	Feijão	Trigo
2013	Soja	Milho	-
2014	Soja	Feijão	Trigo
2015	Soja	Milho	-
2016	Soja	Feijão	Trigo
2017	Feijão	Milho	-
2018	Soja	Feijão	Trigo
2019	Soja	Milho	-

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

O experimento foi realizado a campo em uma área com produção anual de soja/milho ou soja/feijão/trigo, em um delineamento em blocos casualizados de 12 tratamentos, sendo a testemunha a inoculação usual com *Bradyrhizobium* na semente, os tratamentos seguintes foram inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na semente e/ou tratamento por pulverização nos estádios vegetativos V2 e/ou V6, com 3 repetições, totalizando 36 parcelas medindo 5 x 2,5 m, com área útil de 3 x 1,5 m.

O plantio foi realizado no dia 28 de Dezembro de 2019 onde foi utilizada a cultivar de soja BRASMAX LANÇA 58I60RSF IPRO, que tem características de precocidade e boa arquitetura de planta. Na semeadura foi utilizada semeadora/adubadora manual (do tipo “matraca”), cuja adubação de base foi com o formulado químico 04-24-06 (%N -

%P₂O₅ - %K₂O) na dosagem de 268 kg ha⁻¹ Foi utilizado um espaçamento de plantio de 0,10 m entre plantas e 0,50 m entre linhas, totalizando 200.000 plantas/ha.

As formas de inoculação e coinoculação das plantas foram duas, inoculação nas sementes antes da semeadura e pulverização das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* *Azospirillum brasilense* nas plantas já estabelecidas nos estádios V2 (primeiro trifólio completamente desenvolvido) e/ou V6 (quinto trifólio completamente desenvolvido) da cultura da soja (Tabela 2).

Tabela 2. Relação e descrição dos tratamentos testados no experimento, considerando o Tratamento 1 como a testemunha do experimento.

Tratamentos	Descrição
Testemunha	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na semente.
Tratamento 1	Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> na semente.
Tratamento 2	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> na semente.
Tratamento 3	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> por pulverização no estádio V2.
Tratamento 4	Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V2.
Tratamento 5	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V2.
Tratamento 6	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> por pulverização no estádio V6.
Tratamento 7	Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V6.
Tratamento 8	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V6.
Tratamento 9	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> por pulverização no estádio V2 e V6.
Tratamento 10	Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V2 e V6.
Tratamento 11	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> por pulverização no estádio V2 e V6.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Foram utilizados os seguintes inoculantes ambos na forma líquida: i) *Bradyrhizobium japonicum* com concentração de $1,1 \times 10^9$ UFC/ml; ii) *Azospirillum brasilense* com concentração de $1,1 \times 10^9$ UFC/ml, sendo usado na semente 2 ml/kg de semente e para pulverização utilizou-se uma dose 6x maior diluído em água, isto é, através de testes feitos com a bomba postal de pulverização, detectou-se que a cada 1 minuto de pulverização, aplicava-se 1 litro da calda, então ficou determinado que seria feita a aplicação de 1 minuto em cada parcela, totalizando 1 litro de calda por parcela ($12,5 \text{ m}^2$). A calda para pulverização foi feita com 6 ml de inoculante para cada 1 litro de água. Foi realizada a tríplice lavagem da bomba após a aplicação de cada inoculante, para se evitar contaminações.

As variáveis analisadas nas coletas de dados foram nível de clorofila (gramas), altura de plantas (centímetros), massa seca da parte aérea (gramas), número de vagens, produtividade (kg ha^{-1}) e peso de mil grãos (gramas).

No pico de desenvolvimento vegetativo (estádio Vn) da cultivar foi realizada a avaliação do nível de clorofila das folhas, o qual foi feito com o auxílio de um Clorofilog da marca Falker modelo CFL 1030. Foram feitas análises de 5 plantas parcela⁻¹ aferindo-se 3 folhas planta⁻¹, conforme indicação do manual de instrução do equipamento. Após, foram feitas as médias para realização do cálculo, Soma da média das plantas / Numero de plantas amostradas.

No ponto de maturação fisiológica da planta fez-se a retirada de 5 plantas por parcela, cortadas a 5 cm do solo e levadas para o laboratório para avaliação das variáveis de altura de planta, utilizando-se uma régua para medir do colo da planta até o último trifólio. Já para avaliação de massa seca da parte aérea, foram colocadas as plantas em sacos de papel e levadas para secagem em uma estufa de ventilação forçada à temperatura constante de 65°C até peso constante. Após esta etapa, as plantas secas foram retiradas e pesadas em balança de precisão da marca Shimadzu modelo UX 602H, com divisão de 0,001g.

A contagem do número de vagens foi feita de forma manual, arrancando-as das plantas coletadas e secas.

As variáveis produtividade e peso de mil grãos foram realizadas quando as plantas chegaram em ponto de colheita, com umidade de 14% dos grãos. Foram retiradas as plantas contidas em 1 m^2 dentro da área útil delimitada. Para a avaliação da produtividade, foi realizada a bateção manual para retirar as impurezas e pesagem dos grãos coletados em balança de precisão. A avaliação do peso de mil grãos foi feita através da contagem de mil grãos da amostra aleatoriamente e pesagem em balança de precisão.

Os dados coletados das variáveis analisadas foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de média de Tukey, a nível de 5% de significância.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram verificadas diferenças significativas nas variáveis de nível de clorofila, altura de plantas, número de vagens, massa seca da parte aérea em função dos tratamentos testados, pela Análise de Variância (ANOVA).

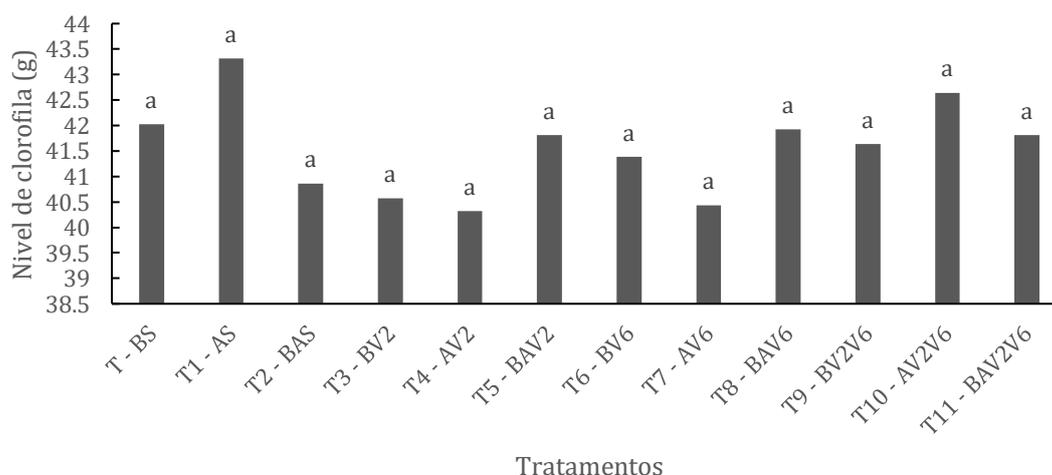
Tabela 4. Valores de Quadrados Médios da Análise de Variância das variáveis dependentes Nível de Clorofila (CLO), Altura de Plantas (ALT. P.), Número de vagens (NUM. VG.), Massa Seca da Parte Aérea (M. SECA), Produtividade (PROD.) e Peso de Mil Grãos (P. 1000 G.).

FV	GL	Quadrados médios					
		CLO (g)	ALT. P. (cm)	NUM. VG.	M. SECA (g)	PROD. (Kg/ha)	P. 1000 G. (g)
TRATAMENTO	11	2,458073	27,033	561,25	138,6	29034,51	4437,12
BLOCOS	2	1,7908	246,725	1418,57	224,02	14700,02	58,33
Erro	22	1,454712	18,87	356,72	201,82	1834,9	79,54
Total	35						
CV		2,9	8,4	21,71	28,87	14,76	7,38

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Não houve diferenças significativas dos níveis de clorofila em função dos tratamentos testados. Os valores encontrados variaram entre 40,5g e 43,5g (Figura 1), que são considerados normais para esse estágio vegetativo (Vn) e não foram influenciados pela aplicação dos inoculantes na semente e via foliar, o que também foi encontrado por Silva (2019), apesar de os valores terem sido menores.

Figura 1. Valores médios do Nível de clorofila (g) em função dos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1 (T1 – AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6), Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 – BAV6), Tratamento 9 (T9 – BV2V6), Tratamento 10 (T10 – AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

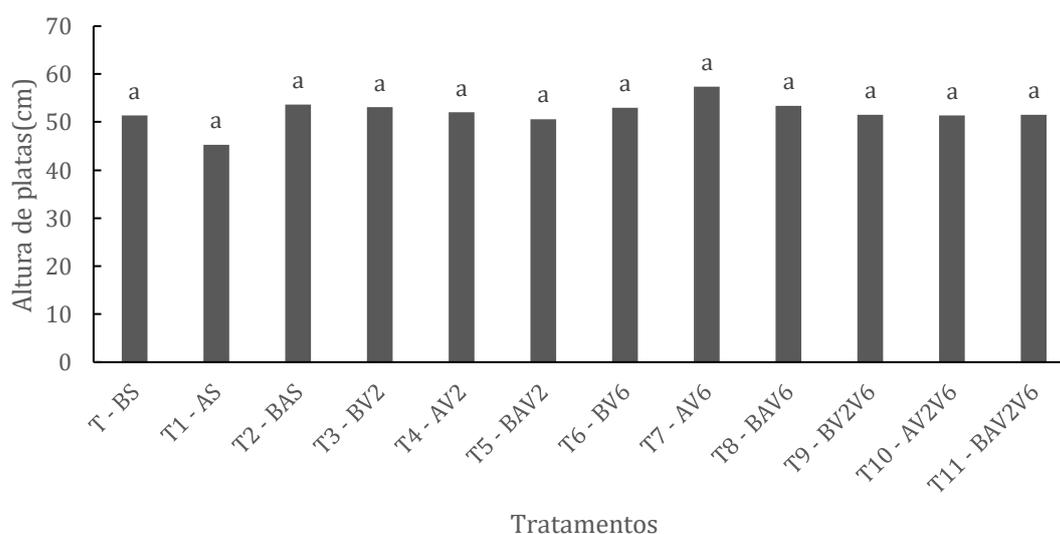
Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste média de Tukey.

A maior média do nível de clorofila no tratamento 2 com a inoculação de *Azospirillum* na semente, corrobora com Jordão et. al. (2010) que explica que isso se dá por uma maior concentração de N na folha, aumentando assim a taxa de absorção de CO₂, o que conseqüentemente resultará em uma maior produção de biomassa.

Em relação à altura de plantas, não verificou-se diferença significativa entre os tratamentos realizados, variando entre 45,26 cm e 57,35 cm (Figura 2), resultado de acordo com Silva et al. (2011), que não encontrou diferença significativa na variável altura de planta avaliando aplicação de inoculante na cultura da soja.

Rocha et al. (2012) afirmam que vários fatores podem promover variações nessa variável, como: época de semeadura, espaçamento, suprimento de água, temperatura, fertilidade do solo, latitude, resposta fotoperiódica das cultivares e outras condições do ambiente.

Figura 2. Valores médios da variável Altura de plantas (cm) em função dos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1(T1 –AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6) Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 – BAV6), Tratamento 9 (T9 – BV2V6), Tratamento 10 (T10 – AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).

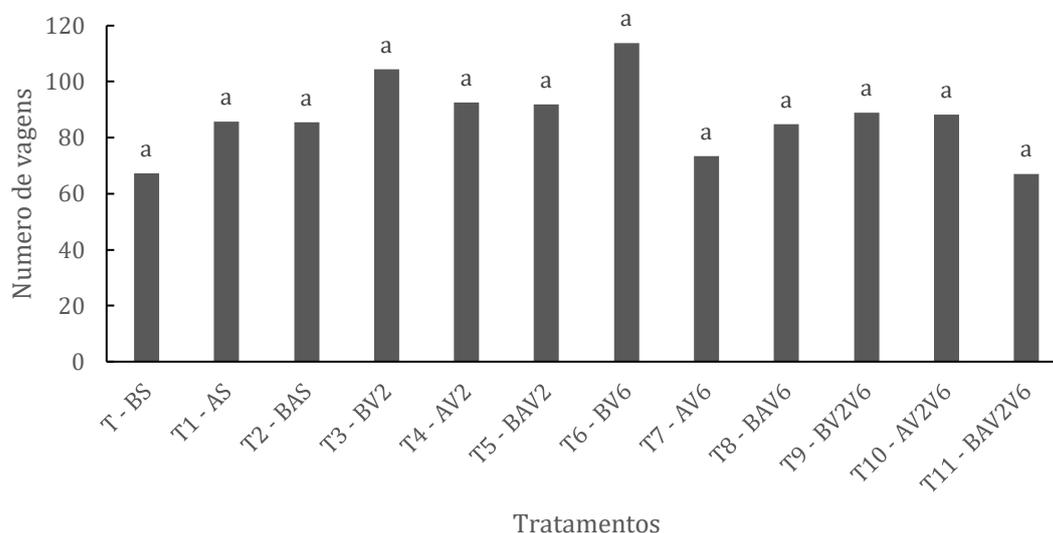


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de média de Tukey.

Em relação ao número de vagens, não foram verificadas diferenças significativas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, com as médias variando entre 67,1 até 113,8 vagens/planta (Figura 3), não corroborando com Manteli et al. (2019) que obtiveram diferença significativa no número de vagens pela coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

Figura 3. Valores médios da variável número de vagens em relação aos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1(T1 –AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6) Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 – BAV6), Tratamento 9 (T9 – BV2V6), Tratamento 10 (T10 – AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).

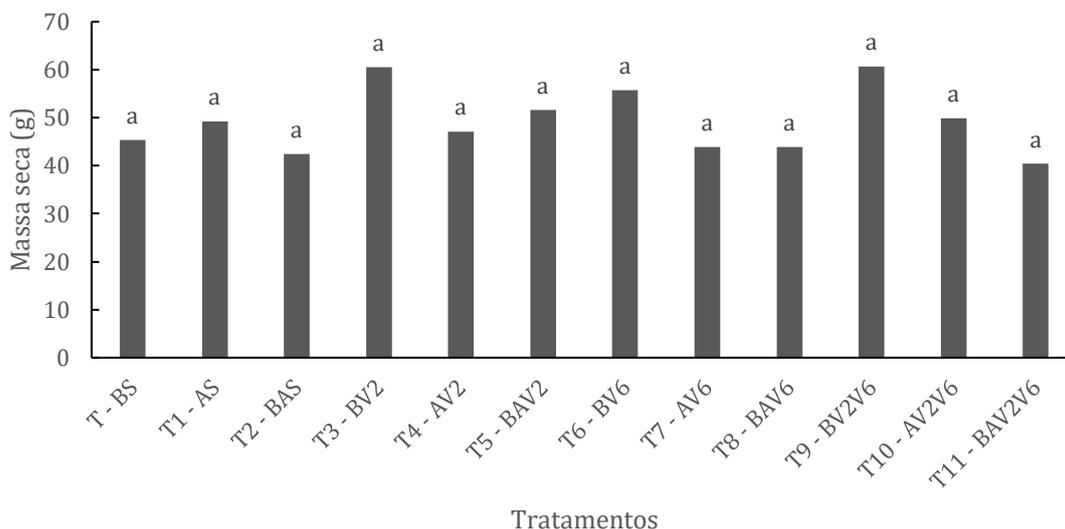


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2020.

Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de média de Tukey.

A variável de massa seca da parte aérea não diferiu significativamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. Os valores variaram de 40,3g a 60,7g (Ffigura 4) e são considerados valores normais para o estágio de desenvolvimento da planta (R5), corroborando com os resultados de Abe et al. (2018).

Figura 4. Valores médios da variável massa seca da parte aérea (g) encontrados em relação aos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1(T1 –AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6) Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 –BAV6), Tratamento 9 (T9 –BV2V6), Tratamento 10 (T10 –AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).



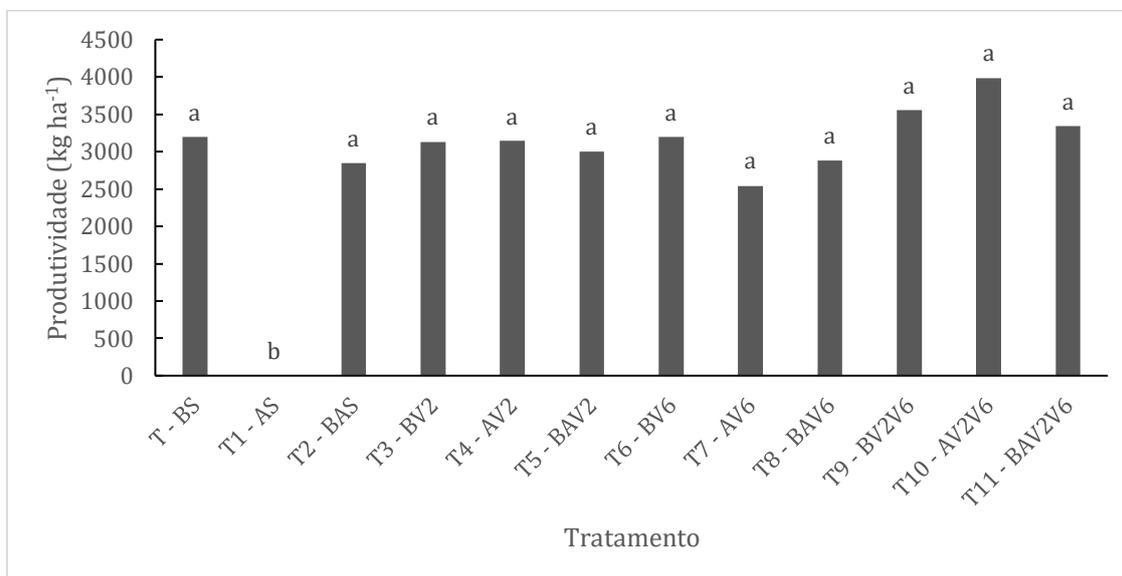
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de média de Tukey.

Em relação à produtividade e ao peso de mil grãos, obteve-se resultados de diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5) e (figura 6), porém, esse resultado foi encontrado devido a impossibilidade de colheita do Tratamento 2 por problemas de baixa germinação. A baixa germinação pode ser explicada pela ação da bactéria *Azospirillum brasilense* pois, segundo Hungria (2011), bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada e, posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas.

Entretanto, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas. Já para os outros tratamentos não foi verificada diferenças significativas pelo teste de Tukey realizado a 5% de probabilidade.

Figura 5. Valores médios da variável Produtividade (kg ha^{-1}) em função dos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1(T1 –AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6) Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 – BAV6), Tratamento 9 (T9 – BV2V6), Tratamento 10 (T10 – AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).

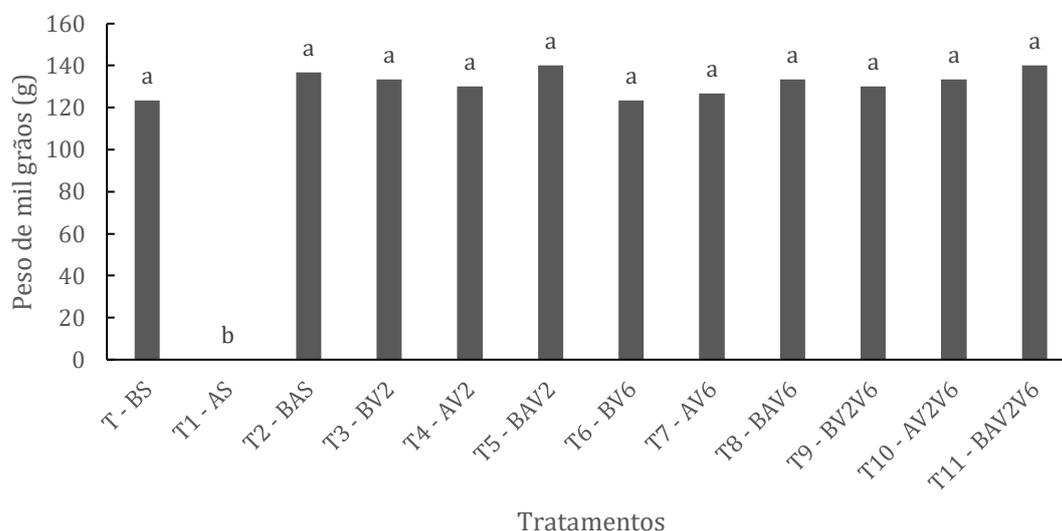


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de média de Tukey.

O resultado obtido para a variável produtividade, de não variação entre os tratamentos que foram possíveis de serem analisados, concorda com Silva (2019) que também não encontrou diferenças significativas na variável produtividade em relação a inoculação e coinoculação de sementes e por pulverização.

Figura 6. Valores médios da variável peso de mil grãos (g) em função dos tratamentos realizados, Testemunha (T – BS), Tratamento 1 (T1 – AS), Tratamento 2 (T2 – BAS), Tratamento 3 (T3 – BV2), Tratamento 4 (T4 – AV2), Tratamento 5 (T5 – BAV2), Tratamento 6 (T6 – BV6), Tratamento 7 (T7 – AV6), Tratamento 8 (T8 – BAV6), Tratamento 9 (T9 – BV2V6), Tratamento 10 (T10 – AV2V6), Tratamento 10 (T10 – BAV2V6).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Nota: As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de média de Tukey.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que não existe diferença significativa entre as formas de inoculação e coinoculação para as variáveis analisadas, em um sistema de produção com 10 anos de produção de soja no sistema de semeadura direta.

As formas de inoculação e coinoculação não afetaram a produção da cultura da soja.

Recomenda-se repetir o experimento em uma área nova em relação ao cultivo da soja, por exemplo, em uma área de pastagem, para verificação das diferentes formas de inoculação e coinoculação em ambientes onde não se tenha histórico de utilização de bactérias *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

REFERÊNCIAS

ABE, R. M.; RODRIGUEZ, C. A.; MAIA, S. S.; DIAS, E. S.; NETO, J. L. L. M. **inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* no crescimento de plantas de soja.** Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC. Maceió-AL, Brasil. Agosto de 2018.

BRUM, A. L.; HECK, C. R.; LEMES, C. DA L.; MÜLLER, P. **A economia mundial da soja: impactos na cadeia produtiva da oleaginosa no rio grande do sul 1970-2000.** Campus UNIJUI. Ijuí, RS. 2000.

CAMPOS, B.C.; HUNGRIA, M. & TEDESCO, V.; **Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto.** R. Bras. Ci. Solo, 25:583-592, 2001.

DAVISON, J. **Plant beneficial bacteria.** Bio/Technology, v.6, p.282-286, 1988.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants.** Science Tech, Springer Verlag, Madison, USA, 1987. p. 1-155.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. **Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio em soja – revisão.** Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FERREIRA, C. M.; PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. **Solos.** Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de Produção, 2. ISSN 1679-8869 Versão eletrônica, Jan/2003.

GERAHTY, N.; et al. **Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point.** Plant Science, v.58, p.1-7. 1992.

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Embrapa Soja. Londrina-PR. 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio da cultura da soja.** Embrapa soja, Londrina, 2001.

HUNGRIA, M. **Rizóbios e *Azospirillum* em Soja e Feijoeiro.** Embrapa Soja, 2014.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R. **Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30, 2005, Pernambuco. Solos, sustentabilidade e qualidade ambiental. Pernambuco: SBCS, UFPE; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. p.1-30. CD-ROM.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Embrapa soja. Londrina-Pr, Brasil. 2007.

JORDÃO, L.T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N. **Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária.** Fertbio. Guarapari - ES, Brasil. Setembro de 2010.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. **Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity.** Trends in Biotechnology. v.7, p.39-43, 1989.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSEL, S. A.; EVANS, H. **Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves.** Dept. of Agricultural Biochemistry, Univ. of Nebraska, Lincoln, EUA. 1983.

KURIHARA, C. H.; VENEGAS, V. H. A.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. **Acúmulo de matéria seca e nutrientes em soja, como variável do potencial produtivo.** Rev. Ceres. Viçosa- Mg, Brasil. v. 60, n.5, p. 690-698, 2013.

MCCLOURE, P. R.; ISRAEL, D. W. **Transport of Nitrogen in the Xylem of Soybean Plants.** American Society of Plant Biologists. EUA. 1979.

MANTELI, C.; ROSA, G. M.; CARNEIRO, L.V.; POSSENTI, J. C.; STEFENI, A. R.; SCHNEIDER, F. L. **Inoculação e coinoculação de sementes no desenvolvimento e produtividade da cultura da soja.** Revista cultivando o saber. Volume 12 - n° 2, p. 111 a 122. Abril a Junho de 2019.

MENDES, L.C.; JUNIOR, F.B.R.; CUNHA, M.H. 20 **Perguntas e respostas sobre fixação biológicas de nitrogênios.** Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. 2010.

PANIAGUA, B. A.; MAZZETTO, E.; ALVAREZ, J. W. R.; FIGUEREDO, J. C. K. **Doses e forma de aplicação de inoculante e seu efeito na cultura da soja.** Revista Varia Scientia Agrárias. v. 05, n.02, p. 19-31. 2017.

ROCHA, R. S.; SILVA, J. A. L.; NEVES, J. A.; SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C. **Desempenho agrônomo de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude em Teresina-PI.** Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v.43, n.1, p. 154-162, 2012.

SILVA, A. F.; CARVALHO, M. A. C.; SCHONIGER, E.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P. A. **Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo.** Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 404-412, Mai/Jun 2011.

SILVA, VINICIUS HENRIQUE. **Doses complementares de inoculante *Bradyrhizobium japonicum* via foliar em diferentes estádios fenológicos na cultura de soja.** Universidade federal de mato grosso. Sinop, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** ARTMED 3. ed. Porto Alegre-Rs, Brasil 2004.

ZILLI, J.E.; RIBEIRO, K.G.; CAMPO, R.J. & HUNGRIA, M. **Influência do tratamento de sementes com fungicidas na nodulação e rendimento de grãos da**

soja. R. Bras. Ci. Solo, 33:917-923, 2009.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; **Eficácia da inoculação de Bradyrhizobium em pré-semeadura da soja.** Pesq. agropec. Bras., Brasília, v.45, n.3, p.335-338, mar. 2010.

ZILLI, J. E; MARSON, L. C; MARSON, B. F; GIANLUPPI, V.; RUBENS JOSÉ CAMPO, R. J.; E HUNGRIA, M. **Inoculação de Bradyrhizobium em soja por pulverização em cobertura.** Embrapa. Roraima. 2008.