

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

PEDRO VICTOR PAIM DO PRADO

**TESTE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS
COM COINOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum*
brasilense EM SOJA**

**UBERLÂNDIA - MG
Junho - 2018**

PEDRO VICTOR PAIM DO PRADO

**TESTE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS
COM COINOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum
brasilense* EM SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial
para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo de
Camargo

**Uberlândia - MG
Junho - 2018**

PEDRO VICTOR PAIM DO PRADO

**TESTE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS
COM COINOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum*
brasilense EM SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial
para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Banca de avaliação:

Prof. Dr. Reginaldo de Camargo
Orientador

Eng^a. Agr. Natália Luiza Almeida de Moraes
Membro da banca

Eng. Agr. Msc. Thiago Prudente Siqueira
Membro da banca

**Uberlândia - MG
Junho - 2018**

AGRADECIMENTOS

Neste momento marcante em minha vida, perto da conquista do tão almejado diploma, quero agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da vida, meus familiares que sempre estiveram ao meu lado, a minha noiva Érica Freire por sempre me apoiar em todas minhas decisões.

Aproveito esse momento para agradecer ao Prof. Dr. Reginaldo de Camargo e a doutoranda Fernanda pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança e pela dedicação.

Por fim agradeço também a todos meus amigos que ajudaram de alguma maneira com pensamentos positivos, com palavras de apoio para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

RESUMO

O Brasil é um país modelo no uso da fixação biológica de nitrogênio, entretanto são poucos autores que pesquisam sobre o uso de mais de um gênero de bactérias agindo isoladas e/ou conjuntamente. Um exemplo é o uso das bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, esta última além da fixação apresenta função de promoção de crescimento. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, de forma isolada e coinoculada, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de um genótipo de soja (AS 3680 IPRO), sob condições de laboratório. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados, com 5 repetições e 4 tratamentos (Testemunha, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e *B. japonicum* + *A. brasilense*). Foram realizados os testes de germinação e de crescimento inicial de plântulas e avaliadas no teste de germinação o número de plântulas normais, anormais e mortas, para o teste de crescimento inicial de plântulas foram avaliados o comprimento de raiz, comprimento da parte aérea (sem os cotilédones), peso seco de raiz e peso seco da parte aérea, sendo essas determinadas no quinto dia após serem colocadas no germinador. O uso de *B. japonicum* e *A. brasilense*, de forma isolada ou em coinoculação, não interferiram na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas na cultivar de soja.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento; *Glycine max*; tratamento de sementes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 A cultura da soja	8
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na soja	10
2.2.1 Inoculação com bactérias do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	10
2.2.2 Inoculação com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>	11
2.2.3 Coinoculação com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

A produção de soja (*Glycine max* (L.) *merrill*) está entre as atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial, sendo o quarto grão mais consumido e produzido mundialmente, atrás de milho, trigo e arroz, além de ser a principal oleaginosa cultivada (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

No mundo são produzidas 312,362 milhões de toneladas de soja, sendo uma área total plantada de 119, 732 milhões de hectares na safra 2015/2016. Os Estados Unidos da América (EUA) são os maiores produtores, com uma produção de 106, 934 milhões de toneladas. Em segundo lugar está o Brasil com 96,50 milhões de toneladas, sendo o país mais exportador de soja do mundo (USDA, 2016).

Segundo levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima-se que a produção mundial de soja para safra 2016/2017 será de 336, 62 milhões de toneladas, com aumento de 7,56% em relação à safra anterior. Para o Brasil estima-se uma produção de 104 milhões de toneladas de soja em grãos, com um crescimento de 7,77% em relação à safra passada. O Mato Grosso é o maior estado brasileiro produtor com área plantada de 9,140 milhões de hectares e produção de 26.058 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Para se alcançar elevada produtividade na cultura da soja utilizam-se fertilizantes minerais, aumentando os custos de produção e ocasionando maior impacto ambiental (HUNGRIA et al., 2005), sendo necessário de 300 a 400 kg ha⁻¹ de nitrogênio (N). De acordo com EMBRAPA (2014) citado por Battisti; Simonetti (2015) estimativas indicam que nos próximos anos no Brasil, haverá um aumento no uso de fertilizantes para suprir as necessidades da agricultura. Por isso é de suma importância encontrar soluções que possam reduzir esse possível cenário. Nesse sentido, as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico podem cumprir importante papel, garantindo então elevadas produtividades, com a redução dos custos de produção e da utilização de fontes minerais.

Atualmente, as bactérias diazotróficas que intensificam a produção de soja pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* (SILVA et al., 2011). Estes microrganismos infectam a planta formando, naturalmente, nódulos em suas raízes. Dentro destas raízes, essas bactérias possuem a capacidade de quebrar a tripla ligação do dióxido de nitrogênio atmosférico (N₂), que não é utilizado pelas plantas, transformando-o em uma forma assimilável (TAIZ; ZIEGER, 2013; MALAVOLTA; MORAES, 2006). Esse processo

pode suprir toda a necessidade de N da planta, dispensando a adubação mineral (TAIZ; ZIEGER 2013).

Segundo Rodrigues et al. (2012) e citado por Bulegoni et al. (2015) bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* além da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), podem produzir compostos promotores de crescimento ou estimular a produção endógena da planta desses compostos, sendo denominados associativas facultativas, pois proliferam-se na superfície das raízes, podendo penetrar no vegetal. Alguns destes compostos já foram detectados, produzidos na interação planta-microrganismo, tais como: a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (CROZIER et al., 1988), citocininas (CACCIARI et al., 1989), ácido giberélico (BOTTINI et al., 1989), além de outros compostos indólicos (CROZIER et al., 1988).

Mesmo com a eficiência da FBN na soja, estudos devem ser realizados para confirmar os ganhos com cultivares de alta produtividade (HUNGRIA et al., 2013). Em associação com esses dois gêneros de bactérias em cultivos da soja. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, de forma isolada e co-inoculada, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de um genótipo de soja, em condições de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja é uma planta da família das leguminosas originária da Ásia (China e regiões próximas) e que foi domesticada há cerca de 4500 a 4800 anos nessa região com o objetivo de utilizar o grão na dieta humana (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

A difusão da cultura ocorreu inicialmente na Europa em 1739, nos Estados Unidos em 1765 e no Brasil em 1882 no estado da Bahia, seguido por São Paulo em 1891 chegando ao Rio Grande do Sul no ano de 1914. A cultura se propagou no Rio Grande do Sul, especialmente no município de Santa Rosa, na década de 1930 com finalidade de utilizar o grão nas propriedades, como fonte de proteína na alimentação de suínos (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Posteriormente, a partir da década de 1960, ocorreu grande demanda por óleo e proteína em todo o mundo e a soja expandiu-se por todo o território nacional diante da avidez do mercado por alimento energético e proteico.

A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta, atuando em, praticamente, todos os processos fisiológicos e bioquímicos. A disponibilidade de água é importante, principalmente, em dois períodos de desenvolvimento da soja: germinação-emergência e floração-enchimento de grãos. Durante o primeiro período, tanto o excesso quanto o déficit de água são prejudiciais à obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas. A semente de soja necessita absorver, no mínimo, 50% de seu peso em água para assegurar boa germinação. Nessa fase, o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85% do total máximo de água disponível e nem ser inferior a 50% (EMBRAPA, 2013).

A necessidade total de água na cultura da soja, para obtenção do máximo rendimento, varia entre 450 a 800 mm ciclo⁻¹, dependendo das condições climáticas, do manejo da cultura e da duração do ciclo. A soja melhor se adapta a temperaturas do ar entre 20 °C e 30 °C, sendo a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento em torno de 30 °C. O crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo a temperaturas menores ou iguais a 10 °C. Temperaturas acima de 40 °C têm efeito adverso na taxa de crescimento, provocam distúrbios na floração e diminuem a capacidade de retenção de vagens (EMBRAPA, 2013).

A soja apresenta alta sensibilidade ao fotoperíodo sendo variável com a cultivar, ou seja, determinada cultivar é induzida ao florescimento quando o fotoperíodo, ao decrescer, atinge valores iguais ou inferiores ao mínimo crítico exigido pela variedade, razão pela qual é chamada de planta de dias curtos (GIANLUPPI et al., 2009; EMBRAPA, 2011; FARIAS et al., 2007). Contudo, de acordo com Kiihl; Garcia (1989) citado por Freitas (2011) a implantação de programas de melhoramento de soja no Brasil possibilitou o avanço da cultura para as regiões de baixas latitudes, através do desenvolvimento de cultivares mais adaptados por meio da incorporação de genes que atrasam o florescimento mesmo em condições de fotoperíodo indutor, conferindo a característica de período juvenil longo.

Avanços científicos em tecnologias para manejo de solos, com técnicas de correção da acidez, o processo de inoculação das sementes para FBN e a adubação balanceada com macronutrientes e micronutrientes, permitiram a cultura expressar a sua potencialidade nas diversas condições edafoclimáticas do território brasileiro (FREITAS, 2011).

Concernente à nutrição mineral na soja, o N é o nutriente mais requerido pela cultura, estimando-se que para produzir 1 t de grãos sejam necessários 80 kg de N. Assim

as fontes de N disponíveis para a soja são os fertilizantes nitrogenados e a FBN, esta última (com estirpes responsivas associadas à seleção de cultivares susceptíveis às interações), proporciona alta eficiência, além de dispensar a adubação nitrogenada, minimizando os gastos com adubação mineral (EMBRAPA, 2013).

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na soja

2.2.1 Inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*

O Brasil tem sido considerado um país modelo na aplicação dos benefícios da FBN, especialmente pela utilização de estirpes elite de *Bradyrhizobium* com a cultura da soja, em simbioses capazes de suprir totalmente a demanda da planta por nitrogênio (HUNGRIA et al., 2013).

O processo de FBN faz com que a soja receba uma alta quantidade de N, nutriente essencial para o desenvolvimento da planta. O processo se constitui na introdução de uma bactéria em simbiose com a semente. Quando a raiz da soja está se desenvolvendo no solo essa bactéria infecta a raiz, cria um tumor e, dentro deste nódulo, fixa o nitrogênio (AGROLINK, 2010). A associação simbiótica entre as raízes da soja e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* contribui com todo o nitrogênio que a soja necessita para produtividade média de aproximadamente 3.600 kg ha⁻¹, além de proporcionar valores entre 20 e 30 kg/ha de nitrogênio para a cultura em sucessão (GITTI, 2015).

Como a soja não é uma cultura nativa do Brasil e a bactéria que fixa o nitrogênio atmosférico (*Bradyrhizobium*) não existe naturalmente nos solos brasileiros, é indispensável que se faça a inoculação da soja nessas condições, para garantia de obtenção de alta produtividade (EMBRAPA, 2013). Em geral, a inoculação é feita nas sementes, mas o inoculante pode também ser aplicado no sulco, em dose 2,5 superior à das sementes, para evitar o contato direto do *Bradyrhizobium* com agrotóxicos (HUNGRIA et al., 2013). Os micronutrientes Cobalto (Co) e o Molibdênio (Mo) são indispensáveis para a eficiência da FBN, para a maioria dos solos onde a soja vem sendo cultivada. As indicações técnicas atuais desses nutrientes são para aplicação de 2 a 3 g de Co e 12 a 25 g de Mo (SFREDO; OLIVEIRA, 2010) via semente ou em pulverização foliar, nos estádios de desenvolvimento V3 à V5.

A legislação brasileira exige uma concentração mínima de 1 x 10⁹ células viáveis por grama ou ml do produto inoculante. A dose a ser aplicada deve fornecer, no mínimo,

1,2 milhões de células viáveis por semente. Além disso, o volume de inoculante líquido a aplicar não deve ser inferior a 100 mL, sem qualquer diluição em água, por 50 kg de semente. Em áreas que não são inoculadas há vários anos, particularmente em solos arenosos, é recomendável a aplicação de cerca de 6 milhões de células semente (EMBRAPA, 2013).

Segundo Câmara (2014) e referenciado por Gitti (2015) a reinoculação em áreas com histórico de cultivo de soja deve ser realizada anualmente, pois no período de entressafra de soja ocorre competição entre bactérias fixadoras do nitrogênio e outros microrganismos nativos da área agrícola, reduzindo a população de bactérias eficientes na fixação do nitrogênio menos adaptadas as variações de regime hídrico e térmico do que os microrganismos nativos, predominando bactérias menos eficientes na fixação do nitrogênio. Outros fatores que podem reduzir a eficiência da FBN são as mudanças climáticas globais, com crescentes períodos de seca e de altas temperaturas, e fatores como a incompatibilidade com agrotóxicos nas sementes (HUNGRIA et al., 2013).

2.2.2 Inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*

Já existem novas pesquisas com FBN com outros tipos de bactérias, e em diversas culturas como no milho (NOVAKOWISKI *et al.*, 2011), trigo (BÉCQUER GRANADOS *et al.*, 2012), cana-de-açúcar (SCHULTZ *et al.*, 2012) ou até mesmo forrageiras para formação de pastagem (MOREIRA *et al.*, 2014). Neste contexto, bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* merecem atenção, pois além da FBN, podem produzir compostos promotores de crescimento ou estimular a planta a produção endógena desses compostos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Segundo Davison (1988) e Kloepper *et al.* (1989) citado por Hungria (2011) 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.

As BPCP (como por exemplo, as do gênero *Azospirillum*) podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2008), aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN *et al.*, 2008), produção de hormônios como auxinas, citocininas (TIEN *et al.*, 1979), giberilinas (BOTTINI *et al.*, 1989), etileno (STRZELCZYK *et al.*, 1994) e uma variedade de outras

moléculas (PERRIG et al., 2007), solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004), e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008).

Vários são os estudos que confirmam que *Azospirillum brasilense* proporcionam um maior crescimento de raízes em diferentes espécies cultivadas. Bárbaro et al. (2009) citado por Bulegon et al. (2015) observaram sistemas radiculares mais desenvolvidos em plantas de soja que receberam inoculação nas sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. Tien et al. (1979) referenciado por Hungria (2011) verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* eram o ácido indol-acético (AIA), giberilinas e citocininas.

Em um levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos, Okon e Labandera-Gonzales (1994) relataram que em 60 a 70% dos experimentos foram obtidos incrementos na produtividade devido à inoculação de *Azospirillum*, com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%. Em outro levantamento realizado na Argentina, com 273 ensaios de inoculação com *A. brasilense* em trigo (*Triticum aestivum* L.), em 76% dos casos houve aumento médio na produtividade de 256 kg ha⁻¹, em milho (*Zea mays* L.), 85% dos casos responderam positivamente, com um aumento médio na produtividade de 472 kg ha⁻¹ (DÍAZ-ZORITA; FERNANDEZ CANIGIA, 2008). Em soja a utilização de *Azospirillum brasilense* possibilitou um maior número e maior massa de nódulos do que os tratamentos em que foram aplicados apenas fertilizantes minerais (GITTI, 2015).

2.2.3 Coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*

Considerando as principais limitações atuais e potenciais da FBN em soja e os benefícios atribuídos a diversas culturas pela inoculação com *Azospirillum*, observou-se que a coinoculação com ambos organismos pode melhorar o desempenho das culturas, em uma abordagem que respeita as demandas atuais de sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental (HUNGRIA et al., 2013).

Conforme Ferlini (2006) e citado por Battisti e Simonetti (2016) as utilizações de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* com a técnica da coinoculação em leguminosas incrementam consideravelmente a nodulação e o crescimento radicular, proporcionando uma melhora na absorção de água e nutrientes, resultando em ganho de produtividade.

Pesquisas realizadas pela EMBRAPA em parceria com a empresa total Biotecnologia para o lançamento do produto Azotototal Max® (produto que contém estirpes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*), mostraram incrementos expressivos no rendimento, onde o tratamento com reinoculação em comparação com o tratamento controle obteve ganhos de 16% no rendimento de grãos de soja (RUFINO, 2014).

Existem em outros países estudos que reportam os benefícios da coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, entretanto há poucos estudos nas condições brasileiras sendo necessário conduzir um maior número de ensaios nessas condições (HUNGRIA et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Análises de Sementes pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizada na cidade de Uberlândia, Minas Gerais.

A cultivar de soja utilizada para o experimento foi AS 3680 IPRO da empresa Agroeste, de ciclo superprecoce, grupo de maturação 6,8 e hábito de crescimento indeterminado. Foi realizado teste de germinação prévio desse material antes da inoculação, obtendo-se 80% de plântulas germinadas.

Foram utilizados os inoculantes de *A. brasilense* cepas – AbV5 e AbV6 (concentração mínima de 2×10^8 células mL^{-1}) de um produto comercial na dose correspondente a 100 mL 50 kg^{-1} de sementes de soja e *B. japonicum* cepas - SEMIA 5019 e SEMIA 5079 (concentração mínima 5×10^9 unidades formadoras de colônias g^{-1}) de um produto comercial na dose correspondente a 100 mL ha^{-1} . Os inoculantes foram depositados em sacos plásticos, onde se acondicionou também as sementes e, posteriormente, realizada a agitação dos sacos plásticos por 1 minuto, atingindo cobertura homogênea sobre as sementes. Para facilitar a homogeneização, foi adicionado a todos os tratamentos 0,5 mL de água destilada, incluindo na testemunha. Os tratamentos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na inoculação das sementes e suas respectivas doses nos testes de germinação e crescimento de plântulas.

Tratamentos	Dosagem (mL^{-1})	
	Germinação	Crescimento de plântulas
T1 Testemunha	Sem inoculante	Sem inoculante
T2 <i>B. japonicum</i>	0,40	0,16
T3 <i>A. brasilense</i>	0,31	0,13
T4 <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>	0,40 + 0,31	0,16 + 0,13

Obs: Em todos os tratamentos adicionou-se 0,5 mL de H_2O .

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (DBC), com 4 tratamentos e 5 repetições. Para o teste de germinação, 50 sementes tratadas foram dispostas em uma folha de papel germitest umedecida com água destilada em quantidade duas vezes a do peso do papel e, posteriormente, coberta com mais uma folha de papel germitest, da mesma forma umedecida e depois enroladas. Cada parcela foi constituída de

4 rolos, embrulhadas posteriormente em um único rolo, totalizando 200 sementes por parcela. Foram dispostas na posição vertical dentro de germinador com temperatura constante de 25°C por 8 dias, de acordo com as prescrições das RAS (BRASIL, 2009).

As avaliações foram realizadas no terceiro, quarto e quinto dia depois de inseridas no germinador, para determinação da porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas nas avaliações inicial e final. As plântulas que desenvolveram todas as estruturas essenciais do embrião foram classificadas como normais, segundo critérios indicados nas Regras para Análise de Sementes. Dentro das plântulas consideradas anormais estão as deformadas que são aquelas que podem ter sofrido algum dano mecânico e/ou genético, e as deterioradas que foram aquelas atacadas por algum patógeno com sinais de infecção visíveis, as sementes que não apresentaram nenhum sinal de germinação foram consideradas mortas, segundo critérios das Regras de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

Para o teste de crescimento de plântulas, 20 sementes tratadas foram dispostas na posição superior de uma folha de papel germitest umedecida com água destilada em quantidade duas vezes a do peso do papel, com os hilos voltados para baixo e posteriormente coberta com mais uma folha de papel germitest, da mesma forma umedecida e depois enroladas. Cada parcela foi constituída de 4 rolos, embrulhadas posteriormente em um único rolo, totalizando 80 sementes por parcela. Foram dispostas na posição vertical dentro de germinador com temperatura constante de 25°C por 7 dias, de acordo com as prescrições das RAS (BRASIL, 2009).

Para o teste de crescimento de plântulas, procedeu-se a leitura do comprimento de raiz (CP), comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas normais, por meio de uma régua com metragem em centímetros aferidos no quinto dia depois de colocadas no germinador. Posteriormente procedeu-se a avaliação do peso seco de plântulas onde se avaliou o peso seco radicular (PSR) e peso seco parte aérea (PSA), excluindo destas os cotilédones. As repetições de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de papel, identificados, e levados à estufa com circulação de ar forçada, mantida à temperatura de 65°C, até que atingissem massa constante (NAKAGAWA, 1999) para avaliação de massa seca de plântulas (MSA) e radículas (MSR). Após este período, cada repetição teve a massa avaliada em balança com precisão de 0,001g, e os resultados médios expressos em gramas por plântula.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de homogeneidade das variâncias de Levene, ambos a 0,01 de significância,

com o programa SPSS. Em seguida, os dados foram submetidos a análises estatísticas, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores em porcentagem referentes ao número de tratamentos não diferiram estatisticamente para nenhum dos parâmetros avaliados no teste de germinação (Tabela 2).

Tabela 2. Germinação aos 5 dias em função da inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.

Tratamentos	Plântulas Normais (%)			Plântulas Anormais (%)			Mortas (%)
	Fortes	Fracas	Total	Deformadas	Deterioradas	Total	
Testemunha	61,2	20,0	81,2	6,6	7,1	13,7	5,5
<i>B. japonicum</i>	64,0	16,6	80,0	4,9	8,5	13,4	6,1
<i>A. brasilense</i>	64,4	16,4	80,8	4,9	7,9	13,4	6,4
<i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>	68,3	15,5	83,8	5,0	5,6	10,6	5,6
CV (%)	8,28	18,78	4,19	35,04	24,60		41,13
DMS	10,02	6,04	6,42	3,52	3,36		4,56

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05.

Bulegon et al. (2014) com o propósito de avaliarem o desempenho de *B. japonicum* e *A. brasilense*, de forma isolada e coinoculada na germinação e desenvolvimento inicial de diferentes cultivares de soja cultivadas na região oeste do Paraná, concluíram em seus estudos em condições laboratoriais que a coinoculação não se mostrou eficiente frente à inoculação isolada das respectivas bactérias, em relação as cultivares testadas.

Garcia (2015) visando avaliar o efeito de doses de *B. japonicum* e *A. brasilense* isolados e em conjunto na produtividade e qualidade fisiológica das sementes de dois cultivares de soja, observou que para a interação com 200 mL ha⁻¹ de *B. japonicum* coinoculado com 100 mL ha⁻¹ de *A. brasilense*, obteve-se 85,5% de germinação na cultivar TMG 1179RR. Este mesmo autor relata ainda que os valores de germinação mais expressivos foram para as doses de 200 e 400 mL ha⁻¹ de *A. brasilense* aplicado isoladamente. De acordo com Bullegon et al. (2014) isso pode ter ocorrido devido a processos fisiológicos hormonais, uma vez que para ocorrer a germinação ocorre a liberação natural de hormônios, onde a presença de *A. brasilense* pode promover ou complementar a liberação dessas substâncias devido a características genéticas inerentes a cada material.

Bullegon et al. (2014) em seu trabalho objetivando avaliar o desempenho de *A. brasilense* e *B. japonicum* de forma isolada e coinoculada, na cultivar ND 4990 constataram que na primeira contagem de germinação (4 dias), o tratamento com coinoculação apresentou também o maior número de plantas germinadas. É importante salientar, como infere Silva et al. (2010) citado por Bullegon et al. (2014), que cada cultivar possui características distintas entre si, podendo apresentar maior ou menor tempo de germinação.

Concernente aos valores obtidos em porcentagem de plântulas mortas, os resultados observados contrastam com o de Garcia (2015), que na cultivar TMG 4182 as sementes que receberam 200 mL ha⁻¹ de *A. brasilense* isoladamente e coinoculadas com 100 ml ha⁻¹ de *B. japonicum* apresentaram diferenças significativas dos demais tratamentos apresentando taxa elevada de mortalidade, aproximadamente em 25%.

Para o teste de crescimento inicial de plântulas, também não foram verificadas diferenças para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento de Plântulas da parte Aérea (CPA), Crescimento Radicular de Plântulas (CR), Peso Seco Aéreo (PSA) e Peso Seco Radicular (PSR) em função da inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.

Tratamentos	---- (cm) ----		--- (g planta ⁻¹) ---	
	CPA	CR	PSA	PSR
T1 Testemunha	6.19	14.38	0,025	0,017
T2 <i>B. japonicum</i>	6.64	14.83	0,030	0,016
T3 <i>A. brasilense</i>	6.61	14.23	0,030	0,018
T4 <i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i>	6.71	14.28	0,026	0,017
CV (%)	9,03	6,90	19,770	11,690
DMS	1,11	1,87	0,010	0,004

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05.

Não foi observado diferenças no CPA (Tabela 3), o que corrobora com o trabalho relatado por Bullegon et al. (2014) que na cultivar Turbo os tratamentos com inoculantes *B. japonicum* (Simbiose Nod®) e *A. brasilense* (Graminante®) de forma isolada e em coinoculação não diferiram entre si. Apesar disso, em comparação numérica, o tratamento com coinoculação dos dois inoculantes proporcionou discreto aumento nesse quesito.

O CR não foi significativo para nenhum tratamento aplicado (Tabela 3). Entretanto, Bullegon et al. (2014) objetivando em seu trabalho avaliar o desempenho de

B. japonicum e *A. brasilense*, de forma isolada e coinoculada, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de soja em diferentes cultivares na região oeste do Paraná, obteve para a cultivar ND 4990 maiores comprimentos radiculares com a inoculação isolada de *A. brasilense*, sendo 29% superior a cultivar Turbo. Segundo Ferlini et al. (2006) isso é explicitado pelo balanço de AIA (Ácido Indolacético) promovido por *A. brasilense*. Tien et al. (1979) citado por Hungria (2011) verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* eram três, dentre eles o ácido indol-acético (AIA).

Com relação ao PSA também não houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo que todos os tratamentos apresentaram comportamento similar à testemunha (Tabela 3). Bullegon et al. (2015) em estudo semelhante avaliando o desenvolvimento de dois genótipos de soja em casa de vegetação submetidos à inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, obteve maior massa seca de parte aérea no tratamento testemunha com aplicação mineral de 240 kg ha⁻¹ de N do que nos tratamentos com a presença de *A. brasilense* na cultivar Coodetec 250.

Para o PSR não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos. Este resultado corrobora com os de Bárbaro et al. (2009). Estes autores também não encontraram diferencial entre os tratamentos para matéria seca de raiz na cultivar MG/BR 46 Conquista na região de Colina-SP.

A inoculação com *B. japonicum* não interferiu na germinação das sementes durante a primeira contagem e a segunda, mostrando que essa bactéria pode ser definida como neutra para essa etapa da cultura, tendo apenas efeito a partir do desenvolvimento da planta (ZILLI et al., 2006). O que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

Burdman et al. (1996) e Dardanelli et al. (2008) citados por Garcia (2015) afirmaram que a presença do *A. brasilense*, tanto pela fixação de nitrogênio atmosférico quanto pela produção de fitohormônios, contribuem para o incremento do sistema radicular devido ao aumento de radículas e/ou diâmetro das raízes.

Segundo Oliveira, Urquiaga e Baldani (2003) referenciados por Bárbaro et al. (2009) os efeitos promovidos pela co-inoculação de BPCP e rizóbios, parecem estar sobre a influência de sinais específicos entre os genótipos bacterianos envolvidos e o genótipo da planta hospedeira. Sendo assim, Bullegon et al. (2014) ressaltam a necessidade de ampliar as pesquisas quanto ao comportamento do *A. brasilense* e do *B. japonicum* quando em associação e para cada cultivar específico.

5. CONCLUSÕES

O uso de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* inoculados isoladamente ou em coinoculação não interferiu em germinação, vigor, crescimento de plântulas, massa seca de parte aérea e radícula na cultivar de soja AS 3680 IPRO.

REFERÊNCIAS

- AGROLINK. **Inoculação de semente da soja é essencial para produtividade**, 2010. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/inoculacao-de-semente-da-soja-e-essencial-para-produtividade_106944.html>. Acesso em: 07 mar.2017.
- BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; JUNIOR, L. S. B.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. da. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. *Colloquium Agrariae*, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 1-7, Jan. 2009.
- BATTISTI, A. M.; SIMONETTI, A. P. M. M. Inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja. **Revista cultivando o saber**, Cascavel, v. 8, n. 3, p. 294-301, set. 2015.
- BÉCQUER GRANADOS, C. J.; LAZAROVITS, G.; NIELSEN, L.; QUINTANA, M.; ADESINA, M.; QUIGLEY, L.; LALIN, I.; IBBOTSON, L. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas e dos variedades de trigo. Fase II: Invernadero, **Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Granada-México, v. 3, n. 5, p. 985-997, Set. 2012.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Rockville-Estados Unidos, v. 90, p. 45-47, Dez 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009.398p.
- BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. 1, p. 26-37, 2014.
- BULEGON, L. G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, Chapingo-México, v. 34, n. 2, p. 169-176, Dez. 2015.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant Soil**, Basel, v. 115, p. 151-153, Jan 1989.
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2016/2017 (Sexto levantamento)**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_14_15_28_33_boletim_graos_marco_2017bx.pdf>. Acesso em: 07 de março de 2017.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol**, USA, v. 54, p. 2833-2837, Jul 1988.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.155-166.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa, 2013. 265 p. (Sistemas de produção, 16).

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil 2012 e 2013. Sistemas de Produção**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 115 p. (Sistemas de produção, 15).

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Circular técnica, n. 48).

FERLINI, H.A. **Co-inoculación en soja (*Glicyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Santa Fé, Engormix, 2006. 6p.

FREITAS, M. C. M. de. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 12, Mai 2011.

GARCIA, A. **Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2015.

GITTI, D. C. Inoculação e coinoculação na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F. **Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015**. Curitiba: Midiograf, 2015. p. 15-28.

HIRAKURI, M. H. LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2014. 70 p.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation

of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (eds.). **Nitrogen fixation in agriculture: Forestry ecology and environment**. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers, 2005. p. 25-42.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Tecnologia de Coinoculação da Soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 33., 2013, Londrina. **Anais...** Londrina-PR: EMBRAPA, 2013. p. 151-153.

MALAVOLTA, E.; M. F. MORAES. **Serie estudos e documentos - O nitrogênio na agricultura brasileira**. CETEM. Rio de Janeiro, 2006.

MOREIRA, C. D.; PEREIRA, D. H.; COIMBRA, R. A.; MOREIRA, D. A. Germinação de gramíneas forrageiras em função da inoculação de bactérias. **Sci. Elec. Archi**, Brasília, v. 6, p. 90-96, 2014.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Porto Alegre: Departamento de plantas de lavouras da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Evangraf, 2005.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24 .

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.;

NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 1687-1698, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi, **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, sup. 1, p. 196-202, Mar. 2012.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.

RUFINO, C. **Coinoculação combina alto rendimento com sustentabilidade na produção de soja e de feijoeiro**. Notícias Embrapa Soja, 2014. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=914> Acessado em: 10 de abril de 2017.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. V.; BODDEY, R. B.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 261-268, Fev. 2012.

SFREDO, G.J.; OLIVEIRA, M.C.N. de. **Soja: Molibdênio e Cobalto**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 36 p. (Documentos, 322).

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

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

TAIZ, L. E E. ZIEGER. **Fisiologia vegetal**. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2013, USA.

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

USDA (United States Department of Agriculture). 2016. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington, DC, USA.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; CAMPO, R. J.; GIANLUPPI, V.; HUNGRIA, M.; SMIDERLE, O. J. **Avaliação da fixação biológica de nitrogênio na soja em áreas de primeiro cultivo no cerrado de Roraima**. Embrapa: Roraima, 2006. 9 p. (Comunicado Técnico, 20).

