

COINOCULAÇÃO E INOCULAÇÃO COM *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* E *AZOSPIRILLUM* SP EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA

GALLO, Hiago Franklin.
SIMONETTI, Ana Paula Morais Mourão.
FEDERICE, Yasmin Fernanda.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a germinação e desenvolvimento das plântulas de soja com coinoculação e inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum* sp, e enfatizar a viabilidade destas técnicas para o desenvolvimento da cultura da soja. O delineamento experimental foi montado em esquema inteiramente casualizado (DIC), com oito tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram compostos por duas cultivares de soja (BMX 63I64 IPRO e M 5947 IPRO) tratadas com diferentes inoculantes e doses comerciais à base de *Bradyrhizobium japonicum* (500 mL 50 kg⁻¹ de sementes) e *Azospirillum* sp. (250 mL 50 kg⁻¹ de sementes). Os dados avaliados foram germinação e desenvolvimento inicial de plântulas aos cinco e oito dias após instalação do experimento. Os resultados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). De acordo as análises realizadas os melhores resultados foram obtidos na interação da cultivar BMX 63I64 IPRO com as bactérias *Azospirillum* sp. e *B. japonicum* por meio de coinoculação durante o tratamento de sementes.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max* L.; fixação biológica de nitrogênio; bactérias.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja é uma das maiores commodities agrícolas no Brasil, sendo a produção nacional considerada atualmente a segunda maior a nível mundial. De acordo com o levantamento da safra de grãos 2022/2023, divulgado pela Conab (2023), a produção brasileira está estimada em 154.605,9 milhões de toneladas na safra, espera-se que na próxima safra tenha um aumento aproximado de 5% em relação a passada, correspondendo a um aumento de 1,6% em relação à passada, refletindo assim uma produção de 3,9 milhões de toneladas a mais e também sendo considerada um recorde.

A importância econômica desta cultura no cenário nacional impulsiona o desenvolvimento de pesquisas que tem por objetivo o aumento contínuo da produção de grãos e que mantenha o Brasil em uma posição competitiva em relação ao mercado mundial. Neste sentido, os estudos sobre tratamento de sementes (TS) têm avançado nos últimos anos. Entre um dos principais focos destes estudos estão o uso da tecnologia de inoculação e coinoculação de sementes de soja com bactérias capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN) (NONATO, 2016).

O FBN é importante no processo de produtivo de grãos de soja por disponibilizar nitrogênio atmosférico na forma que pode ser utilizada pelas plantas, reduzindo assim os custos de produção, pois devido à alta necessidade da cultura por nitrogênio (para produção de 1000 kg de grãos são

necessários 83 kg de N), se fosse necessário o fornecimento total de nitrogênio para a planta de soja via fertilizante mineral a produção destes grãos no país seria inviável do ponto de vista econômico (SFREDO, 2008; ZUFFO *et al.*, 2016).

Devido ao importante papel do nitrogênio no desenvolvimento da soja, o cultivo de soja no Brasil tornou-se viável devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio, e embora os benefícios da inoculação e coinoculação sejam evidentes muitos produtores ainda são resistentes ao uso. Assim, objetivou-se avaliar a germinação e desenvolvimento das plântulas de soja com coinoculação e inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum* sp, e enfatizar a viabilidade destas técnicas para o desenvolvimento da cultura da soja.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O processo de inoculação é realizado durante o TS pela adição de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* às sementes, que posteriormente por meio de simbiose com as plantas de soja formam nódulos radiculares, que servirão de abrigo, fonte de proteção e alimento para as bactérias, e em troca, estas realizarão a captura de nitrogênio atmosférico (N₂), que é reduzido pela ação da enzima nitrogenase em amônia, e posteriormente transformada em compostos nitrogenados, forma que será utilizada pelas plantas de soja (HUNGRIA *et al.*, 2006a). Já a técnica de coinoculação consiste na utilização de uma segunda bactéria para a inoculação da soja, juntamente com o *Bradyrhizobium* (HUNGRIA *et al.*, 2013).

A coinoculação tem sido especialmente associada ao uso de bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*, devido a capacidade de estimularem a produção de hormônios vegetais resultando em um maior crescimento das plantas (FERLINI, 2006; MASCIARELLI *et al.*, 2013). Assim, a eficiência da FBN pode ser aumentada por meio da coinoculação de bradirrizóbios e *Azospirillum* sp, possibilitando ainda, maior absorção de água e nutrientes, com incremento em produtividade (GALINDO *et al.*, 2018).

3. METODOLOGIA

O experimento foi realizado durante o mês de novembro do ano de 2019, no Laboratório de Sementes pertencente ao Centro Universitário da Fundação Assiz Gurgacz (FAG), localizada na cidade de Cascavel, Paraná.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram compostos por duas diferentes cultivares (BMX 63I64 IPRO e M 5947 IPRO) e duas bactérias (*Azospirillum* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*) usadas na inoculação e coinoculação, durante tratamento de sementes.

A cultivar BMX 63I64 IPRO, comercializada pela empresa Brasmax, possui ciclo precoce, grupo de maturação 6,3 e hábito de crescimento indeterminado; e a M 5947 IPRO, posicionada pela empresa Monsoy, é de ciclo superprecoce, grupo de maturação 5,9 e também de hábito de crescimento indeterminado.

A dose do inoculante à base de *B. japonicum*, estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (concentração mínima 7×10^9 UFC mL), utilizada no ensaio foi 500 mL 50 kg^{-1} de sementes e para o inoculante à base de *Azospirillum* sp. (concentração mínima de 1×10^{10} UFC L) de 250 mL 50 kg^{-1} de sementes. Dois tratamentos (T1 e T2), considerados como testemunhas, não receberam tratamento de inoculação ou coinoculação. A descrição dos tratamentos pode ser observada na Tabela 1.

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

Tratamentos	Cultivar	Dosagem da bactéria (mL 100 g^{-1} de semente)	
		<i>Azospirillum</i> sp.	<i>B. japonicum</i>
TRAT1	M 5947 IPRO	0	0
TRAT2	BMX 63I64 IPRO	0	0
TRAT3	M 5947 IPRO	1,00	0
TRAT4	BMX 63I64 IPRO	1,00	0
TRAT5	M 5947 IPRO	0	2,00
TRAT6	BMX 63I64 IPRO	0	2,00
TRAT7	M 5947 IPRO	1,00	2,00
TRAT8	BMX 63I64 IPRO	1,00	2,00

Nota: Em todos os tratamentos foram utilizados 0,5 mL de água destilada.

O tratamento de semente com os inoculantes foi realizado em sacos plásticos, onde as doses correspondentes de cada tratamento foram depositadas sobre as sementes e, posteriormente, realizada a agitação por 1 minuto quando atingida cobertura homogênea. Para facilitar a homogeneização, foi adicionado a todos os tratamentos 0,5 mL de água destilada, inclusive nos tratamentos testemunha.

Os tratamentos foram compostos por rolos montados com 50 sementes tratadas e dispostas em duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada em quantidade correspondente a duas vezes e meia do peso do papel e, posteriormente, coberta com mais uma folha de papel germitest, da mesma forma umedecida. Cada repetição foi constituída de um rolo, armazenados posteriormente em

um único volume, totalizando 200 sementes por tratamento. Estes foram dispostos na posição vertical em câmara de germinação tipo BOD com luz constante e temperatura de 25°C até a realização dos testes, de acordo com as prescrições das RAS (BRASIL, 2009).

Os efeitos da inoculação e coinoculação foram avaliados por meio de teste de germinação em que foi observado número de sementes germinadas, plântulas normais, anormais e mortas, aos cinco e oito dias após a instalação do experimento; e do desenvolvimento inicial de plântulas com mensuração do comprimento e massa verde de planta inteira, aos oito dias após a instalação do ensaio. Em ambas as avaliações foram utilizados os mesmos rolos, ou seja, após a análise de germinação os rolos retornaram para a câmara de germinação. Os dados resultantes do experimento foram submetidos à análise de variância e quando detectada diferença significativa pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do programa Assisat (SILVA e AZEVEDO, 2016).

4. ANÁLISES E DISCUSSÕES

Na avaliação de germinação cinco dias após a instalação do ensaio foi constatado que entre todas as variáveis analisadas apenas o número de plantas anormais foi significativamente influenciado pelos tratamentos testados, como pode ser observado na Tabela 2. O tratamento em que foi utilizado a cultivar BMX 63I64 IPRO inoculada com *B. japonicum* desenvolveu o maior número de plântulas anormais, enquanto que nos tratamentos com M 5947 IPRO sem tratamento, inoculada com *Azospirillum* sp e BMX 63I64 IPRO coinoculada com *B. japonicum* e *Azospirillum* sp apresentaram menores números de plântulas anormais (Tabela 2).

Após oito dias do início do experimento, o número de plântulas normais também foi semelhante entre os fatores analisados, assim como a quantidade de plântulas anormais, não havendo conseqüentemente diferença estatística entre os tratamentos. Porém, em relação ao número de sementes germinadas e plântulas mortas foi verificada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2 - Porcentagem de sementes germinadas e de plântulas normais, anormais e mortas aos cinco dias após a montagem do experimento em função de diferentes cultivares de soja e doses *B. japonicum* e *Azospirillum* sp, usadas em inoculação e coinoculação, Cascavel (PR), 2019.

Tratamentos	Sementes germinadas	Plântulas		
		Normais	Anormais	Mortas
TRAT1	92 a	84 a	8 b	8 a
TRAT2	93 a	83 a	9 ab	7 a
TRAT3	96 a	89 a	7 b	4 a
TRAT4	94 a	86 a	8 ab	6 a
TRAT5	93 a	83 a	9 ab	5 a
TRAT6	95 a	81 a	14 a	5 a
TRAT7	95 a	86 a	8 ab	5 a
TRAT8	96 a	89 a	6 b	4 a
Média geral	94	85	9	6
*CV (%)	2,5	4,1	24,0	38,8

Em que: *Coeficiente de variação. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. TRAT1 - M 5947 IPRO sem bactéria; TRAT2 - BMX 63I64 IPRO sem bactéria; TRAT3 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT4 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT5 - M 5947 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT6 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT7 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*; TRAT8 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*.

Tabela 3 - Porcentagem de sementes germinadas e de plântulas normais, anormais e mortas aos oito dias após a montagem do experimento em função de diferentes cultivares de soja e doses *B. japonicum* e *Azospirillum* sp, usadas em inoculação e coinoculação, Cascavel (PR), 2019.

Tratamentos	Sementes germinadas	Plântulas		
		Normais	Anormais	Mortas
TRAT1	89 ab	51 a	37 a	11 ab
TRAT2	86 b	44 a	42 a	13 a
TRAT3	93 ab	46 a	47 a	6 ab
TRAT4	94 ab	59 a	34 a	6 ab
TRAT5	91 ab	54 a	37 a	8 ab
TRAT6	95 a	58 a	36 a	5 b
TRAT7	94 ab	45 a	48 a	6 ab
TRAT8	96 a	61 a	34 a	4 b
Média geral	92	53	40	8
*CV (%)	3,2	14,1	16,1	37,9

Em que: *Coeficiente de variação. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. TRAT1 - M 5947 IPRO sem bactéria; TRAT2 - BMX 63I64 IPRO sem bactéria; TRAT3 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT4 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT5 - M 5947 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT6 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT7 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*; TRAT8 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*.

Como pode ser observado na Tabela 3, nos tratamentos em que a cultivar BMX 63I64 IPRO foi inoculada com *B. japonicum* e coinoculada com as duas bactérias houve um maior número de

sementes germinadas e menor quantidade de plântulas mortas, enquanto a testemunha desta mesma cultivar quando não inoculada mostrou-se inferior comparado aos demais tratamentos, como maior número de sementes mortas e menor desenvolvimento por apresentar maior número de plântulas mortas (Tabela 3). Isso pode ser justificado devido a *B. japonicum*, contribuir para a sobrevivência e crescimento inicial das plantas ao fornecer nutrientes essenciais, especialmente nitrogênio, que é fundamental para o crescimento saudável das plantas (HUNGRIA *et al.*, 2006a).

Ainda oito dias após o início do ensaio, na avaliação de desenvolvimento de plântulas, foi verificado que a massa verde das plântulas foi influenciada significativamente pelos tratamentos, enquanto em relação ao comprimento não houve diferença estatística (Tabela 4). A cultivar BMX 63I64 IPRO sem tratamento, tratada com *Azospirillum* sp e coinoculada desenvolveu-se de forma mais positiva que os demais tratamentos, ou seja, apresentou maior massa verde, enquanto na cultivar M 5947 IPRO quando não tratada ou inoculada com *Azospirillum* sp. foi observado um menor desenvolvimento em relação a esta variável (Tabela 4).

Tabela 4 - Massa verde (g) e comprimento (cm) de plântulas aos oito dias após a montagem do experimento em função de diferentes cultivares de soja e doses *B. japonicum* e *Azospirillum* sp., usadas em inoculação e coinoculação, Cascavel (PR), 2019.

Tratamentos	Massa Verde (g)	Comprimento (cm)
TRAT1	0,66 b	14,64 a
TRAT2	0,78 a	13,73 a
TRAT3	0,65 b	13,80 a
TRAT4	0,80 a	14,61 a
TRAT5	0,73 ab	16,82 a
TRAT6	0,73 ab	16,17 a
TRAT7	0,75 ab	17,58 a
TRAT8	0,79 a	17,13 a
Média geral	0,74	15,56
*CV (%)	5,4	9,7

Em que: *Coeficiente de variação. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. TRAT1 - M 5947 IPRO sem bactéria; TRAT2 - BMX 63I64 IPRO sem bactéria; TRAT3 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT4 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp.; TRAT5 - M 5947 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT6 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *B. japonicum*; TRAT7 - M 5947 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*; TRAT8 - BMX 63I64 IPRO com bactéria *Azospirillum* sp. e *B. japonicum*.

Em teste realizado por Gitti (2015), o autor observou que a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *A. brasilense* pode resultar em plantas com maiores valores de massa de raízes por planta, o que consequentemente pode resultar em maior massa e número de nódulos. Porém, Santos (2018) quando comparou tratamentos com inoculação e coinoculação, também utilizando as bactérias dos gêneros

Bradyrhizobium e *Azospirillum*, obteve melhores resultados em relação a produtividade quando os tratamentos foram somente inoculados. E, Zuffo (2016) também analisando a influência da associação ou uso individual destas bactérias constatou que não há interferência na produtividade nas condições em que foi realizado o estudo.

Ainda há uma grande variabilidade na literatura sobre os resultados que podem ser alcançados com a inoculação e coinoculação, e nesse sentido Bárbaro-Torneli *et al.* (2018) destacam que os ganhos do uso destas técnicas dependem da relação estabelecida entre a soja e bactérias envolvidas durante a FBN, ou seja, somente a eficiência da interação entre a seleção de estirpes e a cultivar utilizada garantirá o fornecimento de nitrogênio que a planta necessita para resultar em ganho esperado.

Além da interação entre as cultivares de soja e as bactérias utilizadas neste estudo, o tempo de avaliação pode ter influenciado nos resultados obtidos. Segundo Hungria (2006b) é possível observar a formação de nodulação em média de 10 a 12 dias após a emergência, como as avaliações foram realizadas até oito dias após a inoculação e coinoculação das sementes possivelmente resultados adicionais podem ser alcançados em futuros testes que em as avaliações sejam conduzidas por um maior período de tempo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados comprovam que o desempenho de inoculantes a base de *Azospirillum* sp e *B. japonicum* na coinoculação da cultura da soja pode ser benéfico, porém varia em função da cultivar. Durante o processo de germinação e desenvolvimento de plântulas da cultivar BMX 63I64 IPRO ocorre aumento do número de sementes germinadas e maior desenvolvimento de massa verde quanto feito a coinoculação com *Azospirillum* sp em conjunto com *B. japonicum* no tratamento de sementes. O mesmo tratamento quando aplicado na cultivar M 5947 IPRO não resultou em ganho nas variáveis analisadas.

REFERÊNCIAS

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; FINOTO, E. L.; TOKUDA, F. S.; SANTOS, G. X. L.; MARTINS, M. H.; CORDEIRO-JUNIOR, P. S.; PASQUETTO, J. V. G.; GASPARINO, A. C.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R. S. de; MATEUS, G. P.; HIPOLITO, J. L. Avaliação de cultivares de soja no estado de São Paulo em resposta à aplicação de inoculantes no sulco de semeadura. **Nucleus**, edição especial, p. 55-62, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399 p.

CONAB - **COMPANHIA BRASILEIRA DE ABASTECIMENTO**. Acompanhamento da safra Brasileira de grãos. Safra 2022/2023, v. 10. n.11. Brasília, novembro, 2023. 103p.

FERLINI, H. A. **Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. Artículos Técnicos – Agricultura. 2006. Disponível em: <<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>> Acesso: 28 de novembro de 2023.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZZETTI, S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ROSA, P. A. L. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.22, n.1, p.51-56, 2018.

GITTI, D. C. Inoculação e coinoculação na cultura da soja. In: PITOL, C.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; GITTI, D. C.; LOURENÇÃO, A. L. F. **Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015**. Curitiba: Midiograf, 2015, 161 p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition in plant productivity**. Texas: Studium Press, 2006a. cap. 2. p. 43-93.

HUNGRIA, M.; FRANCINI, J. C.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; ARIHARA, J. Nutrição de nitrogênio da soja no Brasil: contribuições de fixação biológica de N₂ e fertilizante N para produção de grãos. **Canadian Journal of Plant Science**, vol. 86, n. 4, p. 927-939, 2006b.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and *Azospirillum*: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

MASCIARELLI, O.; URBANI L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative Mechanism for the Evaluation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by *Azospirillum brasilense* Strains and Its Effects on the Germination and Growth of Maize Seedlings. **Journal of Microbiology**, vol. 51, n. 5, p. 590-597, 2013.

NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com *Azospirillum brasilense* e reguladores vegetais**. 2016. 79p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.

SANTOS, K. M. M. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* na soja como estratégia para aumento de produtividade e redução do uso de nitrogênio. 2018. 23p. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Faculdade evangélica de Goianésia.

SFREDO, G. J. **Soja no Brasil**: Calagem, adubação e nutrição mineral. Londrina: Embrapa Soja, 2008, 148 p.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

ZUFFO, A. M.; BRUZI, A. T.; REZENDE, P. M. DE; BIANCHI, M. C.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; RIBEIRO, A. B. M.; VILELA, G. L. D. Morphoagronomic and productive traits of RR® soybean due to inoculation via *Azospirillum brasilense* groove. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n.13, p. 438-444, 2016.