

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

LETÍCIA DO SOCORRO CUNHA

**INTERAÇÃO SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E DOSES DE NITROGÊNIO NO
CULTIVO DA SOJA**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2020

LETÍCIA DO SOCORRO CUNHA

**INTERAÇÃO SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E DOSES DE NITROGÊNIO NO
CULTIVO DA SOJA**

Dissertação apresentado à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Lana
Prof. Dr. Alfredo Richart

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cunha, Leticia do Socorro

Interação simbiótica de bactérias e doses de nitrogênio no cultivo da soja / Leticia do Socorro Cunha; orientador(a), José Barbosa Duarte Júnior; coorientador(a), Maria do Carmo Lana, coorientador(a)II, Alfredo Richart, 2020.
64 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Bactérias simbióticas. 2. Fixação biológica do nitrogênio. 3. Glycine max. 4. Inoculação. I. Duarte Júnior, José Barbosa . II. Lana, Maria do Carmo. III. Richart, Alfredo . IV. Título.



unioeste

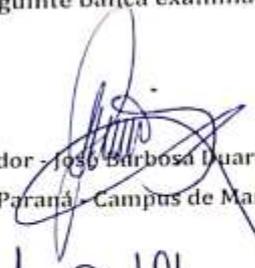
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



LETICIA DO SOCORRO CUNHA

Interação simbiótica de bactérias e doses de nitrogênio no cultivo da soja

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Sistemas de Produção Vegetal Sustentáveis, APROVADA pela seguinte banca examinadora:


Orientador - José Barbosa Duarte Júnior

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Antônio Carlos Torres da Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Milciades Ariel Melgarejo Arrua

Universidad Nacional de Canindeyú (UNICAN)

Marechal Cândido Rondon, 28 de fevereiro de 2020

A Deus.

*A minha mãe Maria do Socorro
Cunha e in memoriam a minha
querida e amada avó Jovelina
Dalva Cunha.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por me proporcionar tantas alegrias e vitórias alcançadas nesta caminhada, por me manter com fé, força, perseverança e determinação por chegar até aqui;

À minha família pelo apoio, em especial a minha mãe Maria do Socorro Cunha e *in memoriam* a minha querida e amada avó Jovelina Dalva Cunha pelo amor incondicional, ensinamentos transferidos, por acreditarem no meu esforço, por serem o pilar e razão pela qual me levanto e luto todos os dias, e aos demais componentes familiares (irmãos, cunhado e sobrinho que fizeram meus dias se tornarem menos estressante e triste, me trazendo alegrias que me proporcionaram altas gargalhadas);

Aos amigos, Erlane Souza, Alessandra, Darlon Alves, Leidiane Lima, Taiara Reis e Vanessa Faria que me deram força nos momentos de tristeza e vibraram nos momentos de alegria em especial a minha parceira irmã Luane Oliveira, pela amizade e apoio, pois passamos por muitos momentos tristes e alegres juntas, porém não desistimos e superamos todas as adversidades. Aos amigos do Norte (paraenses), Nordeste, Sul e Sudeste que me acolheram no Sul, me motivaram e não deixaram que eu desistisse, trazendo-me alegrias e suporte em vários momentos da minha vida. Uma família construída. Gratidão!

Agradeço ao Grupo de Estudos e Pesquisas Avançadas em Fitotecnia, em especial William Bosquete e Samara Brandão por toda ajuda na implantação do experimento e demais colegas.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior, homem íntegro de grande sabedoria, pela disponibilidade, ensinamentos, incentivos, amizade, conselhos, paciência e compreensão mediante as limitações, e ajuda para a construção deste trabalho. Gratidão.

À Universidade pelo ensino gratuito e de qualidade e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por serem excelentes profissionais, e pelo ensinamento repassado, à assistente de coordenação Sra. Leila Dirlene Allievi Werlang por todo apoio e contribuição, pela gentileza, simpatia e prontidão, aos técnicos de laboratório Jucenei Frandoloso, Marta Inês Ferreira Bianchini e Neusa Francisca Michelin Herzog que não mediram esforços para atender e ajudar no que foi possível, as meninas da limpeza, aos guardas e aos trabalhadores de campo da Universidade.

À CAPES, pelo suporte intelectual e apoio financeiro.

Enfim, sou grata à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Obrigada!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

Albert Einstein

RESUMO

CUNHA, L. S. Engenheira agrônoma. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro de 2020. **Interação simbiótica de bactérias e doses de nitrogênio no cultivo da soja.** Orientador: José Barbosa Duarte Júnior. Coorientador: Maria do Carmo Lana e Alfredo Richart.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação, co-inoculação com bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em combinação com aplicação de doses de N sobre as características agronômicas da soja em dois experimentos (casa de vegetação e a campo) na safra 2018/2019. O delineamento experimental utilizado em ambos foi o de blocos casualizado (DBC), em esquema fatorial 4x4 com quatro repetições, sendo quatro tipos de inoculação (sem inoculação, inoculação da bactéria *B. japonicum*, inoculação da bactéria *A. brasilense* e inoculação das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em associação) e quatro doses percentuais de N (0, 2, 4 e 8%). Quanto as avaliações, para ambos os experimentos, foram realizadas no início da floração (estádio R₁) para avaliar os componentes de nodulação e teor e acúmulo de N na planta; e na maturação plena (estádio R₉) para avaliar os caracteres agronômicos da cultura. O uso da inoculação em associação a aplicação de doses de nitrogênio não influenciou as variáveis de altura de plantas, número de vagem por planta, número de grãos por vagem e produtividade da soja para os dois experimentos. O número de nódulos e a massa seca de raiz se mostraram maior na dose de 8 % de N, com uma média de 317 nódulos por planta e 23,42 g planta⁻¹, respectivamente, quando inoculado com o *A. brasilense*. A eficiência de nodulação teve aumento quando utilizada a dose de 2 % de N com valor de 354 g kg⁻¹, utilizando a bactéria *A. brasilense*. O acúmulo de N na parte aérea, obteve valor máximo na dose de 8 % o que correspondeu neste caso em 142 g de N kg⁻¹ com a co-inoculação, apresentando capacidade de respostas diferentes para os caracteres massa seca de raiz e número de grãos por vagem no cultivo protegido. Em condições de campo, o número de nódulos se mostrou maior na dose de 2 % com médias de 46 nódulos por planta quando inoculada com *B. japonicum*, e nas variáveis de massas seca de nódulos, raiz e parte aérea quando inoculado com *A. brasilense* na dose de 8% obtiveram maiores médias com 486,94 mg planta⁻¹, 11,91 g planta⁻¹, 95,5 g planta⁻¹, respectivamente. A eficiência de nodulação teve aumento linear quando utilizada a dose de 8 % de N com valor de 72,32 g kg⁻¹. Para os caracteres número de nódulos e eficiência de nodulação, houve aumento significativo destes quando utilizada a dose de 2 % de N, associado a pratica de adubação nitrogenada e de 8 %, a

massa seca de nódulos, raíz, parte aérea e eficiência de nodulação, obteve resultados mais satisfatórios que as demais doses.

Palavras-chave: Bactérias simbióticas. Fixação biológica do nitrogênio. *Glycine max*. Inoculação. Produtividade.

ABSTRACT

CUNHA, L. S. Agronomist. State University of Western Paraná, February 2020. **Symbiotic interaction of bacteria and nitrogen doses in soybean cultivation.** Advisor: José Barbosa Duarte Júnior. Co-supervisor: Maria do Carmo Lana and Alfredo Richart.

The objective of this work was to evaluate inoculation, co-inoculation with *B. japonicum* and *A. brasilense* bacteria in combination with application of N doses on the agronomic characteristics of soybean in two experiments (greenhouse and field) in the 2018 harvest / 2019. The experimental design used in both was the randomized block (DBC), in a 4x4 factorial scheme with four replications, four types of inoculation (without inoculation, inoculation of the bacterium *B. japonicum*, inoculation of the bacterium *A. brasilense* and inoculation of the bacteria *B. japonicum* and *A. brasilense* in combination) and four percentage doses of N (0, 2, 4 and 8 %). As for the evaluations, for both experiments, they were carried out at the beginning of flowering (stage R₁) to evaluate the components of nodulation and N content and accumulation in the plant; and at full maturation (stage R₉) to evaluate the agronomic traits of the crop. The use of inoculation in association with the application of nitrogen doses did not influence the variables of plant height, number of pods per plant, number of grains per pod and soybean yield for both experiments. The number of nodules and the root dry mass were higher at the dose of 8 % N, with an average of 317 nodules per plant and 23.42 g plant⁻¹, respectively, when inoculated with *A. brasilense*. The nodulation efficiency increased when the dose of 2 % N was used, with a value of 354 g kg⁻¹, using the bacterium *A. brasilense*. The accumulation of N in the aerial part, obtained a maximum value in the dose of 8 %, which in this case corresponded to 142 g of N kg⁻¹ with co-inoculation, presenting different response capacity for the characters dry root mass and number of grains per protected crop. In field conditions, the number of nodules was higher in the dose of 2 % with averages of 46 nodules per plant when inoculated with *B. japonicum*, and in the variables of dry masses of nodules, roots and shoots when inoculated with *A. brasilense* at the 8% dose, they obtained higher averages with 486.94 mg plant⁻¹, 11.91 g plant⁻¹, 95.5 g plant⁻¹, respectively. The nodulation efficiency increased linearly when the dose of 8 % N was used, with a value of 72.32 g kg⁻¹. For the characters number of nodules and nodulation efficiency, there was a significant increase when the dose of 2 % N was used, associated with the practice of nitrogen fertilization and 8 %, the dry mass of nodules, root, aerial part and nodulation efficiency. , obtained more satisfactory results than the other doses.

Keywords: Symbiotic bacteria. Biological nitrogen fixation. Glycine max. Inoculation. Productivity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 ADUBAÇÃO NITROGENADA	2
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGENIO	4
2.3 SIMBIOSE COM <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Azospirillum</i> sp. NA CULTURA DA SOJA.....	5
REFERÊNCIAS	6
3 ARTIGO 1. INOCULAÇÃO, CO-INOCULAÇÃO E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DA SOJA.....	10
RESUMO.....	10
3.1 INTRODUÇÃO	11
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.2.1 LOCAL E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	13
3.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
3.2.3 IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	14
3.2.4 VARIÁVEIS ANALISADAS.....	15
3.2.5 COMPONENTES DE NODULAÇÃO.....	16
3.2.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DOS NÓDULOS, MASSA SECA DA PARTE AÉREA E MASSA SECA DA RAÍZ.....	16
3.2.7 TEOR DE NITROGENIO E EFICIÊNCIA DE NODULAÇÃO.....	16
3.2.8 CARACTERES AGRONÔMICOS.....	16
3.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.4 CONCLUSÕES.....	26
3.5 REFERÊNCIAS	27
4 ARTIGO 2. CARACTERES AGRONÔMICOS DA SOJA EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO, CO-INOCULAÇÃO E DOSES DE N EM LATOSSOLO VERMELHO EUTROFÉRICO.....	33
RESUMO	33
4.1 INTRODUÇÃO	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2.1 LOCAL E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	36
4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.2.3 IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	38
4.2.4 VARIÁVEIS ANALISADAS.....	38
4.2.5 COMPONENTES DE NODULAÇÃO.....	38
4.2.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DOS NÓDULOS, MASSA SECA DA PARTE AÉREA E MASSA SECA DA RAÍZ.....	39
4.2.7 TEOR DE NITROGÊNIO E EFICIÊNCIA DE NODULAÇÃO.....	39
4.2.8 CARACTERES AGRONÔMICOS.....	39
4.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.4 CONCLUSÕES	47
4.5 REFERÊNCIAS	48
5 CONCLUSÕES GERAIS	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*) é uma cultura originalmente chinesa, mais precisamente da região do rio Yangtzé, entretanto, a cultura hoje disseminada e cultivada não se assemelha muito ao seu ancestral comum que apresenta crescimento rasteiro (NUNES, 2016). A cultura foi introduzida no Brasil no Estado da Bahia por Gustavo Dutra, em 1882, porém o crescimento e boa adaptação ocorreram na Região Sul do país, se expandindo posteriormente para o cerrado brasileiro. Dentre os diversos usos do grão da soja pode ser citada a alimentação na forma de óleos e massas, a produção de lecitina, o uso do farelo na ração animal por seu alto valor proteico e na produção de biodiesel, sendo a principal matéria-prima para este produto e representando até 80% da demanda total de fabricação do biodiesel no Brasil (DALL'AGNOL, 2007).

O segundo maior produtor mundial de soja é o Brasil, sendo que o Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná são os três maiores estados produtores, em ordem decrescente, sendo responsável na safra 2018/2019 pela produção de 114,8 milhões de toneladas, em 35,8 milhões de hectares, de acordo com dados levantados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020).

O suprimento adequado de nutrientes ao solo é imprescindível na busca de altas produtividades. Assim, na determinação das necessidades nutricionais da planta devem ser levadas em consideração a absorção e exportação de nutrientes pela cultura durante seu ciclo. A soja é muito exigente em nutrientes, sendo o nitrogênio (N) um macronutriente exigido em grandes quantidades, portanto este deve estar presente no solo em quantidade e equilíbrio adequado (TEIXEIRA FILHO et al., 2010).

O N é constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, sendo, portanto um elemento essencial ao crescimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Sua deficiência inibe rapidamente o crescimento vegetal, podendo manifestar-se através de clorose, que inicialmente ocorre em folhas mais velhas, reduzindo a atividade fotossintética da planta e, conseqüentemente, retardando o crescimento da mesma. As plantas podem obter este nutriente via solo, fixação não biológica, adição de fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (HUNGRIA, 2001).

Na agricultura moderna, o principal veículo de adição de N são fertilizantes inorgânicos e sua utilização é essencial para produção de alimentos requisitada pela população humana. Porém, as pesquisas estão sempre voltadas para a busca de maiores

produtividades com menos custos de produção. Uma alternativa ao uso de fertilizantes inorgânicos é o aproveitamento do N atmosférico (N_2), pela FBN por organismos fixadores de N ou diazotróficos (LOPES, 2007).

O uso da inoculação de bactérias simbióticas e diazotróficas em espécies leguminosas é uma prática usada frequentemente como alternativa a adubação nitrogenada. O método é feito através de bactérias que realizam uma interação simbiótica com a planta, se estabelecendo em suas raízes e realizando a FBN. As bactérias mais utilizadas para realização da inoculação são as da espécie *B. japonicum*, e o *A. brasilense* por se tratar de uma bactéria associativa tem a capacidade de colonizar qualquer tecido vegetal, sendo este mais utilizado para inoculação em gramíneas, como o milho, porém com grande potencial para uso na soja. Sua contribuição para a planta se dá principalmente pela produção de fitormônios, proporcionando maior crescimento radicular, sendo essa uma ação distinta do *B. japonicum* (SILVA NETO, 2019).

Diante do exposto, é necessário fazer estudos mais profundos sobre inoculação, para garantir os benefícios com cultivares de alto rendimento, e que se tenha resultados equivalentes ao incremento no cultivo da cultura e produtividade, em decorrência de meios alternativos. A inoculação e co-inoculação permite fornecer via fixação biológica quantidades de N suficientes para a soja apresentar altos rendimentos agronômicos.

Dessa forma o objetivo do estudo foi avaliar a inoculação, co-inoculação com bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em combinação com aplicação de doses de N sobre as características agronômicas da soja em dois experimentos (casa de vegetação e a campo) na safra 2018/2019.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADUBAÇÃO NITROGENADA

O N nas plantas é o componente responsável por muitas reações dentre elas a estrutura da clorofila, enzimas e proteínas, e a quantidade que o solo apresenta muitas vezes podem variar em decorrência da quantidade de matéria orgânica presente no solo, onde o fertilizante mineral muitas vezes é limitado por ter um alto custo (ALVES, 2006).

No sistema solo-planta de um agroecossistema as principais formas de adição de N podem ser caracterizadas como sais de amônio e nitratos trazidos pela precipitação pluviométrica; aplicação de fertilizantes nitrogenados, obtidos através da fixação industrial do N_2 atmosférico pelo homem; aplicação de fertilizantes orgânicos de origem animal ou

vegetal; fixação biológica do N₂, realizada por microrganismos, de forma simbiótica e assimbiótica (SILVA, 2005).

As formas de perdas de N são através da remoção pelas culturas, erosão, lixiviação, volatilização da amônia e desnitrificação na forma de óxidos de N e N₂. Os processos que interligam os compartimentos do ciclo global do nitrogênio, são fixação de N (atmosférica, industrial, simbiótica do N e não simbiótica do N), decaimento, amonificação, nitrificação, imobilização, desnitrificação (química e assimilatória), volatilização e lixiviação (BINOTTI, 2006).

O N absorvido pelas plantas combina com esqueletos carbônicos para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais. Na fase de enchimento de grãos estas reservas são quebradas, translocadas e armazenadas nestes órgãos, na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 1995). Normalmente, cerca de 80 % do N encontrado nos grãos são provenientes do N estocado na parte vegetativa da planta, e o restante é proveniente do nitrogênio assimilado após floração. Os carboidratos, ao contrário, necessários para o enchimento dos grãos são provenientes da atividade fotossintética “corrente”, ou seja, da atividade fotossintética que está se realizando naquele momento. Por esse motivo, quanto mais tempo durar a área foliar verde após a floração, maior será o rendimento de grãos (DIDONET, 2003).

O N é constituinte de várias moléculas importantes, como proteínas, ácidos nucleicos, alguns hormônios e clorofila. Na cultura da soja, é fundamental, pois os grãos são ricos em proteína, com um teor médio de 40%, sendo a fonte de proteína de menor custo (SILVA et al., 2017). Porém, o suprimento de N pode não ser totalmente atendido mediante a fixação biológica e fornecimento do solo, necessitando, portanto de adubações nitrogenadas complementares para altas (> 3.500 kg ha⁻¹) produtividades. Esse fato se agrava em solos arenosos com baixos teores de matéria orgânica e baixa capacidade de troca catiônica e aniônica, em que as perdas de N por lixiviação, principalmente na forma de amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) são mais evidentes (ALVEZ et al., 2006).

Assim, o uso de fertilizantes em culturas de grãos e fibras também é importante na manutenção das reservas de N do solo. Alta produtividade da soja com doses baixas de N aplicadas, normalmente podem indicar que a quantidade de N exportada com a colheita é maior do que a adicionada, o que contribui para empobrecer o solo (ALVEZ et al., 2006).

Em alguns estudos com fertilização nitrogenada em soja foram alcançadas produtividades maiores do que 4.000 kg ha⁻¹ devido ao fornecimento de N (MENDES et al., 2008). Entretanto outros trabalhos com fertilização nitrogenada alcançaram os mesmos

patamares sem efeito do N mineral (BODRERO et al., 2004). Isso mostra as divergências dos resultados relatados na literatura, o que reforça a necessidade de estudos que contribuam para a temática em questão.

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGENIO (FBN)

O N é um dos nutrientes mais requeridos a produção agrícola nas regiões tropicais e as principais fontes pelas quais as plantas podem obtê-los são a matéria orgânica do solo, os fertilizantes nitrogenados ou FBN. Os fertilizantes nitrogenados além de apresentarem alto custo e contribuírem para a poluição ambiental, tem baixo aproveitamento (máximo de 50%), devido as perdas causadas por práticas culturais inadequadas e por processos como lixiviação, desnitrificação e volatilização da NH_3^+ (CANTARELLA, 2007).

A FBN, que é o principal processo em que o N entra nos ecossistemas naturais, possui um elevado custo energético de maneira que a maioria dos ecossistemas são limitados ou colimitados pela disponibilidade desse nutriente (CHAPIN III et al. 2011).

A FBN é um processo no qual o N atmosférico (N_2) é convertido em amônia (NH_3^+), catalisada por organismos vivos. Os organismos responsáveis pela fixação de N, denominados de diazotróficos são procariotos e realizam a fixação por meio da enzima conhecida como nitrogenase. Essa enzima é sensível ao oxigênio, que pode destruí-la irreversivelmente. Essa reação é endergônica, isto é, a amônia é mais rica em energia que o N atmosférico e, para que a reação ocorra, é necessário fornecimento de energia, armazenada na forma de ATP (SILVEIRA; FREITAS, 2007). A primeira unidade, conhecida por dinitrogenase reductase, se liga a ATP e atua como doador de elétrons, e a outra (dinitrogenase) reduz e coleta o substrato, (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; HOWARD et al., 2013). A FBN é considerada o processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

A capacidade diazotrófica está limitada a bactéria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essas bactérias vivem acopladas nas raízes das plantas em relação de simbiose/mutualismo com essas, produzindo nódulos, estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. Por essa razão a associação entre rizóbios e leguminosas torna-se um tipo de associação de extrema importância agrícola devido a sua peculiaridade na capacidade de formação de estruturas radiculares conhecidas como nódulos. As espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas desse grupo (GRAÇAS et al., 2015).

A FBN é um processo importante no setor agrícola, sendo o processo biológico que contribui com a maior parte do N fixado. Estima-se que fornece cerca de 175 milhões de toneladas de N para a biosfera, ou seja, 65% do total, que o faz ser o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, junto a decomposição orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em todo o globo terrestre, nos diferentes ecossistemas, a FBN contribui na ordem de cerca de 258 milhões de toneladas de N por ano, sendo que esta contribui na agricultura em cerca de 60 milhões de toneladas. (EMBRAPA, 2016).

O compromisso do Brasil foi ampliar o uso da FBN na agricultura, devido ao alto custo dos fertilizantes no mercado nacional, tendo como ferramenta agregada a tecnologia o uso da FBN na melhor formação e aumento de micro-organismos como os rizóbios para a produção (EMBRAPA, 2016).

2.3 SIMBIOSE COM *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum* sp. NA CULTURA DA SOJA

A maioria das estirpes de FBN, aprovadas para espécies florestais, adubo verde, forrageiras e para grãos, pertence ao gênero *Bradyrhizobium* spp. , e muitas já são usadas com sucesso há décadas, sem a perda de suas propriedades simbióticas, como as de soja e de feijão-caupi, o *Bradyrhizobium* spp. tem a vantagem de ser mais estável do que outros gêneros de bactérias fixadoras de N₂, pois os genes relacionados ao estabelecimento e funcionamento da simbiose estão localizados em cromossomo e não em plasmídeos que podem ser perdidos em condições ambientais estressantes (GUIMARÃES et al., 2012; COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013).

Dentre os rizóbios, o gênero *Bradyrhizobium* spp. é de grande importância na agricultura. Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em simbiose com a soja. No Brasil, as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* têm sido amplamente utilizadas como inoculantes nessa leguminosa (CHUEIRE et al., 2003).

A Embrapa Soja é referência mundial no desenvolvimento de tecnologias para a cultura em regiões tropicais e possui várias linhas de pesquisa em Microbiologia do solo: seleção de estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas; caracterização fisiológica, bioquímica e genética de populações estabelecidas de rizóbios; obtenção de estirpes mutantes com maior tolerância ao alumínio (Al³⁺) e manganês (Mn) do solo; seleção de métodos de inoculação; seleção de genótipos de soja de alta eficiência de FBN. Todos esses estudos podem ser beneficiados com o aumento do conhecimento taxonômico dos rizóbios envolvidos na FBN da soja (EMBRAPA, 2007).

Bulegon et al. (2017), afirmaram que o uso da inoculação com *A.brasilense* é bastante estudado no Brasil em culturas anuais voltadas diretamente à produção de grãos, principalmente as gramíneas, como o milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar, e mais recentemente em algumas leguminosas como a cultura da soja. Nestas culturas, os resultados são satisfatórios, elevando várias características biométricas e, principalmente, a produtividade de grãos.

De acordo com Rodrigues et al. (2012), bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* merecem atenção, pois além da 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 (DOBEREINER; BALDANI, 1982).

O interesse na utilização dessa bactéria promotora de crescimento capaz de contribuir para a nutrição de plantas tem aumentado e tende a aumentar nos próximos anos, devido ao alto valor financeiro investido anualmente com fertilizantes e em relação ao que se chama de Agricultura Sustentável (HUNGRIA et al., 2010).

A inoculação com *Azospirillum sp.* é realizada de maneira similar a inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium sp.* O produto pode ser aplicado na forma sólida (como turfa) ou na forma líquida. Também, é necessário ser cauteloso às condições de temperatura, não deixando exposto ao sol e sem aplicação conjunta com agroquímicos, já que se trata de microrganismos vivos (HUNGRIA et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R.; LINCOLN, Z.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação Biológica de Nitrogênio e Fertilizantes Nitrogenados no Balanço de Nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.

BINOTTI, F. F. S. **Fontes, doses e parcelamento do nitrogênio em feijoeiro de inverno no sistema plantio direto**. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira, SP, 2006.

BODRERO, M.; SALVAGIOTTI, F.; ENRICO, J. M.; MENDEZ, J. M.; TRENTINO, N. Does nitrogen fertilization increase grain yield in high yielding systems in the south area of Santa Fe Province, Argentina In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguassu, PR, Brazil. **Proceedings...** Foz do Iguassu: World Soybean Research Conference.

BULEGON, L. G.; BATISTTUS, A. G.; CASTAGNARA, D. D.; GUIMARAES, V. F.; CZEKALSKI, A. M.; RAMPIM, L. *Azospirillum brasilense* potencializa sistema de produção da soja. **Revista campo & Negócios**, Uberlândia, MG, v. 5, p. 9-13, 2017.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. Fertilidade do solo. In: NOVAIS, R. F. Viçosa: UFV, 2007. p. 375-470.

CHAPIN III, F. S.; MATSON, P. A.; VITOUSEK, P. M. **Principals of terrestrial ecosystem ecology**. New York: Springer-Verlag, 2 ed., 2011.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação Taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S Rrna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 834, p. 833-839, 2003.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos. Safra 2019/2020**. v. 7. n. 4. Quarto levantamento/Janeiro 2020. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. p. 1-104.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 48, n. 9, p.1275-1284, 2013.

DALL'AGNOL, A. **Por que fazemos biodiesel de soja**, 14 dez. 2007. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja>>. Acesso em 28 de março 2019.

DIDONET, A.D. Fisiologia. In: MOREIRA, J.A.A.; STONE, L.F.; BIAVA, M. **Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.22-27.

DOBEREINER, J.; J. I. BALDANI. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência Cultura**, Campinas, SP, v. 34, p. 869-881, 1982.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A Soja**. Disponível em:<<http://www.cnpso.embrapa.br/>>. Acesso em: 15 abr. 2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/tema-fixação-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>. Acesso em: 25 set. 2016.

GRAÇAS, J. P. et al. **Microrganismos estimulantes na agricultura.**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 61 p, n. 59, 2015.

GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

HOWARD, J.B.; KECHRIS, K.J.; REES, D.C; GLAZER, A.N. Multiple Amino Acid Sequence Alignment Nitrogenase Component. **Insights into Phylogenetics and Structure-Function Relationships**, v. 8, n. 9, p. 1-12, 2013.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, Circular Técnica, p. 48, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, Switzerland, AG, v. 331, n. 331, p. 413–425, 2010.

JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARÃES, A. A; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 70, n. 6, p. 397-404, 2013.

LOPES, E. S. Fixação biológica do nitrogênio o sistema solo-planta. In: YAMADA, T.; STIPP ABDALLA, S. R.; VITTI, G.C. (Eds.). **Anais do simpósio sobre Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007, p. 43-72.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 2.ed., 887p, 1995.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G.; CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em Latossolos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1053-1060, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 729 p, 2006.

NUNES, J. L. S. **A introdução da soja no Brasil**, 12 set. 2016. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico_361541.html>. Acesso em 28 de março 2019.

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, n. 7, p. 196-202, 2012.

SILVA JÚNIOR, E.B.; FERREIRA, A.; BODDEY, M.R.; ZILLI, J.E.; XAVIER, G.R. Ontogenia da nodulação de feijão-caupi em vaso com solo da área de produção do Centro-Oeste. In: **Anais do III Congresso Nacional de feijão-caupi**. Recife: Recife: IPA, 2013, p. 73-72.

SILVA NETO, C. **Inoculação DE *Bradyrhizobium japonicum* e coinoculação com *Azospirillum brasiliense* via fertilizante organomineral na cultura da soja**. Uberlândia, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/26102/4/Inocula%C3%A7%C3%A3oBradyrhizobiumJaponicum.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

SILVA, D. O.; SILVA, T. R. B.; NETTO, U. M. R.; NOLLA, A. Produtividade da soja submetida à doses de adubo nitrogenado e fertilização foliar. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 6, n. 1, p. 37-43, 2017.

SILVA, E.C. **Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) da uréia, do milho e da crotalária pelo milho sob semeadura direta em solo de cerrado**. 2005. 111f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SILVEIRA, A. P. D. D.; FREITAS, S. D. S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas, **Instituto Agrônomo**, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4 ed., p. 317-341, 2009.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; BENETT, C. G. S. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 797-804, 2010.

3 ARTIGO 1. INOCULAÇÃO, CO-INOCULAÇÃO E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação, co-inoculação com bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em combinação com aplicação de doses de nitrogênio (N) sobre as características agronômicas da soja. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 4x4, sendo quatro tipos de inoculação (ausência de inoculação, inoculação da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* e inoculação das *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em associação) e quatro doses de N (0 % = 0; 2 % = 4,5; 4 % = 9 e 8 % = 18 kg ha⁻¹), com quatro repetições. Não houve interação significativa entre as inoculações e doses de N para massa seca dos nódulos, altura de plantas, número de vagem por planta e produtividade de grãos nas condições estudadas. A utilização das doses crescentes e acima de 2 % de N na semeadura da soja promoveu redução no número de nódulos formados por *Bradyrhizobium japonicum* nas raízes da soja. O número de nódulos e massa seca de raiz se mostrou maior na dose de 8 % de N, com uma média de 317 nódulos por planta e 23,42 g planta⁻¹ respectivamente referente ao tratamento com o inoculante *Azospirillum brasilense*. A eficiência de nodulação obteve valor de 354 g kg⁻¹ quando utilizada a dose de 2 % de N. O acúmulo de N na parte aérea, apresentou valor máximo na dose de 8 % de N e alcançando 142 g kg⁻¹ quando realizou-se a co-inoculação, indicando capacidade de respostas diferentes para os caracteres massa seca de raiz e número de grãos por vagem. A prática de adubação nitrogenada resultou no aumento do número de nódulos apenas da bactéria *A. brasilense* e ganhos significativos de N na planta somente na dose de 8 % de N.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium japonicum*. *Azospirillum brasilense*. Fixação biológica do nitrogênio.

INOCULATION, CO-INOCULATION AND NITROGEN FERTILIZATION IN SOYBEAN CULTURE

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate inoculation, co-inoculation with bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in combination with application of

nitrogen (N) doses on the agronomic characteristics of soybean. The experimental design used was a randomized block in a 4x4 factorial scheme, with four types of inoculation (absence of inoculation, inoculation of the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*, inoculation of the bacterium *Azospirillum brasilense* and inoculation of the *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in association) and four doses. of N (0% = 0; 2% = 4.5; 4% = 9 and 8% = 18 kg ha⁻¹), with four replications. There was no significant interaction between inoculations and N doses for nodule dry mass, plant height, number of pods per plant and grain yield in the studied conditions. The use of increasing doses and above 2% of N in soybean sowing promoted a reduction in the number of nodules formed by *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean roots. The number of nodules and root dry matter was higher at the dose of 8% N, with an average of 317 nodules per plant and 23.42 g plant⁻¹, respectively, referring to the treatment with the inoculant *Azospirillum brasilense*. The nodulation efficiency obtained a value of 354 g kg⁻¹ when the dose of 2% of N was used. The accumulation of N in the aerial part, presented a maximum value in the dose of 8% of N and reaching 142 g kg⁻¹ when performed. co-inoculation, indicating different response capacity for the characters dry root mass and number of grains per pod. The practice of nitrogen fertilization resulted in an increase in the number of nodules only of the bacterium *A. brasilense* and significant gains of N in the plant only in the dose of 8% of N.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*. *Azospirillum brasilense*. Biological nitrogen fixation.

3.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma das mais importantes culturas oleaginosas do mundo e é muito exigente em nutrientes, sendo o nitrogênio (N) um macronutriente exigido em grandes quantidades, portanto este deve estar presente no solo em quantidade adequada. A estimativa da produção de grãos da safra 2018/19 foi de 242,1 milhões de toneladas, apresentando variação positiva de 6,4 % em relação à safra passada, representando aumento na produção de 14,5 milhões de toneladas (Conab, 2019).

No Brasil, a produção de soja foi de 115 milhões de toneladas com uma produtividade de 3.206 kg ha⁻¹ na safra de 2018/2019. No Paraná, a produção de soja foi inferior àquela verificada em 2017/18, principalmente em razão das condições climáticas adversas em fases críticas do desenvolvimento da cultura. Dessa forma, o rendimento médio alcançado foi de 2.989 kg ha⁻¹ e a produção final ficou em 16.252,7 milhões de toneladas, simbolizando diminuição de 15,2 % em comparação ao exercício anterior (Conab, 2019).

A adubação com fertilizantes industrializados é a prática mais comum para o suprimento de N na maioria das culturas agrícolas. Apesar de apresentar alta solubilidade, e consequentemente rápida disponibilidade à absorção, é um nutriente com grandes potenciais de perdas no ambiente e, consequentemente, grandes quantidades do nutriente são necessárias às culturas (Teixeira Filho et al., 2010).

Porém, as pesquisas estão sempre voltadas para a busca de maiores produtividades. Como alternativa ao uso do N, há a possibilidade da utilização de inoculantes à base de bactérias fixadoras de N, principalmente do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum spp.* e por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Milléo e Cristófoli, 2016).

Muitos trabalhos apresentam, quando realizada a inoculação, ganhos em rendimento ou possibilidade da redução das dosagens de N aplicadas, sem haver perdas em produtividade (Cavallet et al., 2000; Hungria et al., 2010; Corassa et al., 2013). Em outros trabalhos, contudo, a FBN consegue suprir apenas parte do N necessário (Fukami et al., 2016), sendo a adubação nitrogenada indispensável para a obtenção de bons resultados (Morais et al., 2016).

Além disso, há casos onde a simples inoculação permite a obtenção de bons rendimentos ou de ganhos em crescimento das plantas (García Oliveras, 2012; Brum et al., 2016; Martinez et al., 2016). A não obtenção de qualquer ganho pela inoculação também é relatada na literatura (Repke et al., 2013).

No Brasil, a FBN é essencial para o cultivo da soja, tornando-se uma das tecnologias mais difundida no cenário agrícola nacional. Além disso, evita a contaminação de águas subterrâneas com nitrato, oriundo do uso intensivo de fertilizantes nitrogenados na agricultura, pois o íon tem alta taxa de lixiviação no solo (Fagan et al., 2007).

Assim, analisando estudos com a inoculação de bactérias *B. japonicum*, e co-inoculação com *A. brasilense*, entende-se que a fixação simbiótica é um processo essencial para o cultivo da soja, onde aumentará o rendimento agrônômico e terá um incremento no conteúdo de N da planta em decorrência de maior FBN realizada, reduzindo os custos de produção com fertilizantes, acréscimo da quantidade de nodulação, produção e outros caracteres que promovem respostas significativas. Além de que se deduz que a co-inoculação com as bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, pode melhorar o desempenho das culturas, respeitando as demandas de sustentabilidade agrícola, socioeconômico e ambiental.

Neste sentido é necessário fazer estudos mais profundos sobre inoculação, para garantir os benefícios com cultivares de alto rendimento, e que se tenha resultados equivalentes ao incremento no cultivo da cultura e produtividade, em decorrência de meios alternativos. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a inoculação, co-inoculação com

bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em combinação com aplicação de doses de N sobre as características agronômicas da soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e condução do experimento

O experimento foi implantado e conduzido na Safra 2018/19, em casa de vegetação Professor Mário César Lopes, área de apoio pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* Marechal Cândido Rondon, localizado nas coordenadas 24°33'24''S de latitude e 54°3'24''W de longitude e altitude de 420 metros.

O solo utilizado como substrato é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de textura argilosa (Embrapa, 2013) e foi caracterizado quimicamente, cujos resultados foram: M.O. = 28 g dm⁻³; P = 14 mg dm⁻³; pH em CaCl₂ = 5,16; K, Ca, Mg, H + Al, respectivamente, 0,38; 3,67; 0,86; 4,40 cmol_c dm⁻³; T = 9,31 cmol_c dm⁻³ e V = 53%. Na casa de vegetação foi instalado *Datalogger* (marca HOMIS modelo 494) com sensor de temperatura e umidade relativa do ar, onde os dados meteorológicos foram coletados e armazenados diariamente, e seus valores médios são apresentados na figura 1, de acordo com o estágio fenológico da soja.

Para realização do experimento, foram utilizado 64 vasos de 12 L contendo solo, homogeneizado e esterilizado, usado como substrato, onde foi semeado quatro sementes por vaso no dia 02 de fevereiro de 2019, a 3 cm de profundidade.

O molhamento das plantas foi realizado diariamente, para repor a água evapotranspirada durante todo o experimento, e o teor de água do solo foi mantido próximo à capacidade de campo.

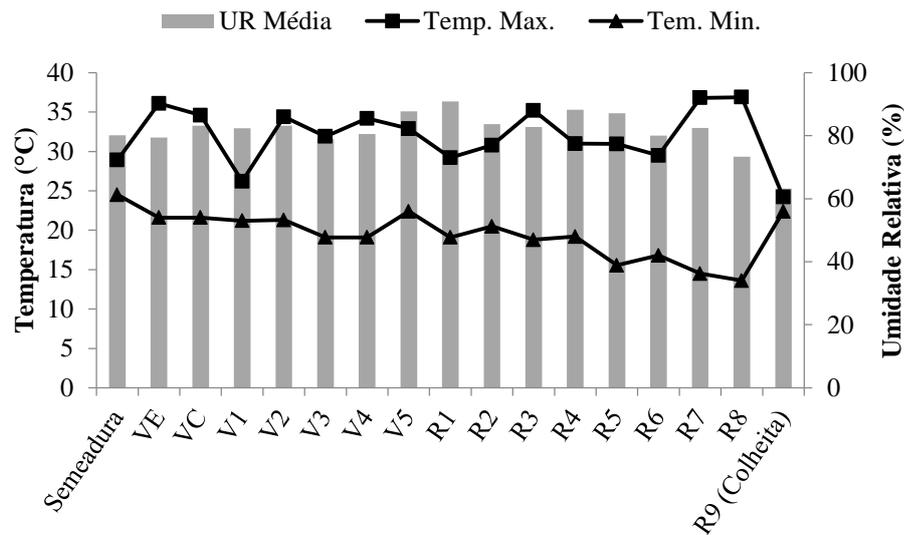


Figura 1. Dados médios de temperaturas máxima e mínima (°C), umidade relativa do ar (UR%) registrados durante a condução do experimento, de acordo com os estádios fenológicos da cultura da soja, Marechal Cândido Rondon - PR, 2019.

3.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizado em esquema fatorial 4x4, sendo quatro tipos de inoculação (sem inoculação, inoculação da bactéria *B. japonicum*, inoculação da bactéria *A. brasilense* e inoculação das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em associação) e quatro doses percentuais de N (0 = 0; 2 = 4,5; 4 = 9 e 8 % = 18 kg ha⁻¹), com quatro repetições, totalizando 16 tratamentos, sendo: T₁ - Sem inoculação + 0 % de N (testemunha); T₂ - Sem inoculação + 2 % de N; T₃ - Sem inoculação + 4 % de N; T₄ - Sem inoculação + 8 % de N; T₅ - Inoculação com *B. japonicum* + 0 % de N; T₆ - Inoculação com *B. japonicum* + 2 % de N; T₇ - Inoculação com *B. japonicum* + 4 % de N; T₈ - Inoculação com *B. japonicum* + 8 % de N; T₉ - Inoculação com *A. brasilense* + 0 % de N; T₁₀ - Inoculação com *A. brasilense* + 2 % de N; T₁₁ - Inoculação com *A. brasilense* + 4 % de N; T₁₂ - Inoculação com *A. brasilense* + 8 % de N; T₁₃ - Co-inoculação + 0 % de N; T₁₄ - Co-inoculação + 2 % de N; T₁₅ - Co-inoculação + 4 % de N e T₁₆ - Co-inoculação + 8 % de N.

Para os tratamentos com a adubação nitrogenada, foram utilizados 2,4 g dos formulados contendo NPK 0-20-20, 2-20-20, 4-20-20 e 8-20-20, correspondendo a 0, 2, 4 e 8 % de N respectivamente, aplicados nos vasos no ato da semeadura.

3.2.3 Implantação do experimento

A cultivar de soja utilizada foi a RK6316 IPRO com a tecnologia INTACTA RR2 PRO™, a qual apresenta grupo de maturação de 6.3, com características singulares tais como: hábito de crescimento indeterminado, flexibilidade de épocas e ambientes de plantio com alto potencial produtivo, apresenta ótima arquitetura de plantas com resistência ao acamamento, sistema radicular agressivo, ciclo favorecendo o cultivo da segunda safra antecipada, alto teto produtivo com resposta ao investimento, além de uma excelente adaptabilidade de clima, solo e de região (Kws, 2009).

Os inoculantes utilizados para a soja foi o Nitro 1000 líquido constituído por bactérias da espécie *B. japonicum* estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080, e o inoculante líquido constituído por bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5 + AbV6, ambos inoculantes com recomendação de utilização de 100 mL para 50 kg de sementes. A mistura foi realizada em um recipiente plástico, simulando a operação de tratamento industrial com inoculadora, no momento da semeadura, até chegar à homogeneidade das sementes.

Aos sete dias após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando as duas plantas mais vigorosas em cada vaso, as quais foram utilizadas para a realização da avaliação dos componentes de nodulação, teor e acúmulo de N na cultura e caracteres agronômicos.

Realizou-se tratamentos culturais como o controle da Ferrugem Asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), com aplicação de um fungicida composto por protioconazol e trifloxistrobina de maneira preventiva em relação ao aparecimento da doença, garantindo assim o maior potencial de controle dos fungos. Foi aplicada a quantidade líquida recomendada do produto, sendo 0,4 L ha⁻¹, em um volume de calda de 150 L ha⁻¹. O controle foi realizado em duas aplicações, sendo a primeira realizada de forma preventiva ao aparecimento da doença, entre os estádios fenológicos R₁ e a segunda 14 dias após no estádio R₅.

Para o controle da Mosca Branca (*Bemisia tabaci*) foi utilizado o produto a base de neonicotinoide (tiametoxam) e piretroide (lambda-cialotrina). A aplicação foi realizada no início da infestação da praga que ocorreu entre os estádios R₁ e R₅, numa dose de 250 mL ha⁻¹, em um volume de calda de 200 L ha⁻¹. O controle foi realizado em duas aplicações. Após 10 dias de intervalo fez-se a reaplicação do produto visando quebrar o ciclo da praga.

3.2.4 Variáveis analisadas

Foram realizadas avaliações no período da floração (estádio R₁) para determinar os componentes de nodulação e o teor e acúmulo de N na planta; e na maturação plena (estádio R₉) para avaliar os caracteres agronômicos da cultura.

3.2.5 Componentes de Nodulação

As plantas foram colhidas no estágio R₁, para avaliar os componentes de nodulação, tais como: número de nódulos, massa da matéria seca dos nódulos; massa da matéria seca da parte aérea; massa da matéria seca da raiz; eficiência de nodulação; teor de nitrogênio na parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Para a determinação do número de nódulos as plantas foram levadas ao laboratório onde foram separadas em raiz e parte aérea. Em seguida as raízes foram lavadas cuidadosamente sobre peneira para evitar perda de nódulos, onde os mesmos, foram destacados das raízes, para determinação do número de nódulos e massa seca dos nódulos, de acordo com Alcântara et al. (2014). Posteriormente fez-se a contagem de cada nódulo presente nas raízes individuais de cada planta, com o auxílio de um contador manual.

3.2.6 Determinação da massa seca dos nódulos, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz

Posteriormente os nódulos foram acondicionados em sacos de papel e levados a estufa, com circulação forçada de ar, mantida à temperatura de 65 °C por 72 horas. Após esfriar em dessecador, cada repetição foi pesada em balança com precisão de 0,001 g (Hungria et al., 2001). Os resultados foram expressos em g por planta. O mesmo procedimento foi realizado com as plantas e raízes para determinar a massa seca da parte aérea e massa seca da raiz.

3.2.7 Teor de Nitrogênio e Eficiência de Nodulação

Após seco em estufa o material foi moído para análise do teor de N total. O conteúdo de N foi determinado a partir de materiais vegetais moídos pelo método de Kjeldahl, de acordo com Bremner (1983), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea. O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N (%) e dividindo por 100 e a eficiência de nodulação foi determinada dividindo-se o N total da parte aérea pela massa seca de nódulos (Melo e Zilli, 2009).

3.2.8 Caracteres Agronômicos

Na fase de maturação plena (R₉) da cultura foram avaliadas plantas para obter resultados equivalentes aos caracteres agronômicos, tais como: altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e rendimento de grãos. A colheita procedeu-se manualmente no dia 10 de junho de 2019.

Antes da colheita realizou-se a medição da altura de plantas, onde foi medida da superfície do solo ao ápice da planta utilizando-se uma fita métrica graduada, e após a colheita procedeu-se a contagens do número de vagem por planta e número de grãos por vagem conforme a quantidade obtida por planta. A determinação da massa de 1000 grãos foi realizada pela contagem e pesagem de 1000 grãos e o rendimento médio foi determinado a partir da pesagem de grãos da unidade experimental com umidade corrigida para 14 % (Alcântara et al., 2014).

3.2.9 Análise estatística

Os dados de nodulação, teor e acúmulo de N e caracteres agronômicos foram submetidos à análise de variância e regressão com *software* SISVAR, ao nível de 5 % de probabilidade de erro (Ferreira, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o número de nódulos (Figura 2) quantificados referentes a bactéria de *Bradyrhizobium japonicum*, apresentou efeito significativo ($p < 0,01$) com valores baixos, onde na dose 0 % de N quantificou-se uma média de 1 nódulo e na dose 2 % de N obteve-se 68 nódulos por planta.

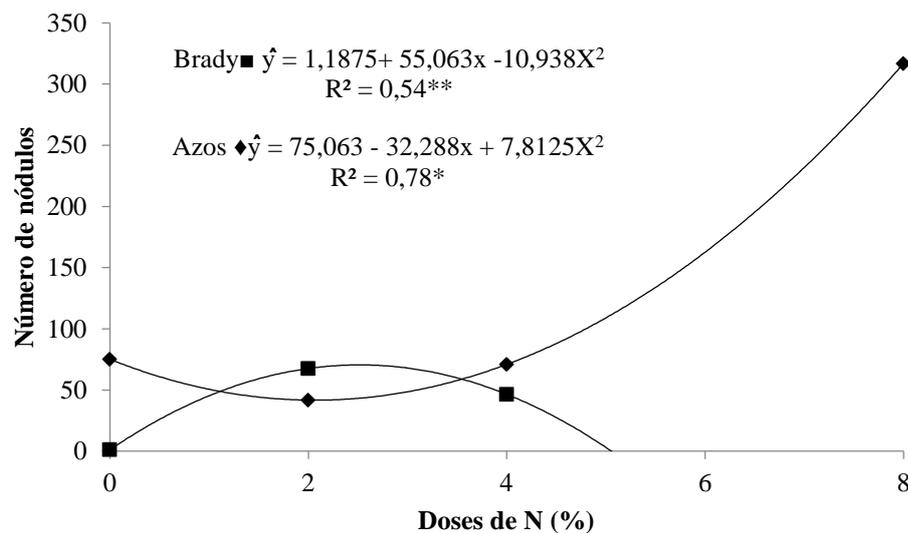


Figura 2. Número de nódulos de raízes de plantas de soja em função da inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

No entanto, verificou-se queda dos números de nódulos nas doses de 4 e 8 % de N aplicados na inoculação com *B. japonicum*, dessa forma, as doses de N na semente, associado a efeitos de temperatura (Figura 1) e influencia do pH do solo, podem culminar na inibição da infecção (estimulada por exsudatos) da bactéria e, conseqüentemente, na formação do número de nódulos por plantas ao incrementar as doses de N.

A baixa nodulação apresentada, pode estar relacionado com a esterilização do solo que foi realizado antes da semente, com o intuito de eliminar organismos do solo, quantificando assim a nodulação apenas providos da inoculação direta e adubação nitrogenada; e para redução da ocorrência de doenças e competição das plantas daninhas. Pode estar associado também ao ato da amostragem, pois quando retirou-se as plantas do vaso para a contagem do número de nódulos no estágio R₁ da cultura, observou-se uma quantidade de nódulos deixados no solo, levado em consideração que havia duas plantas por vaso para a realização das avaliações no estágio R₁ e R₉, assim, isso pode ter evidenciado a redução de nódulos presente nas raízes das plantas.

Conforme Barzotto (2015), o processo de FBN pode ser avaliada pelo número de nódulos e pela massa seca dos nódulos. Este autor obteve resultados parecidos em seu estudo sobre nitrogênio e água como fatores de produtividade da soja (*Glycine max* (L.)), onde observou que os valores de número de nódulos foram diminuindo conforme foi aumentando da dose de N, em cobertura no estágio reprodutivo R₂ da soja, diminuindo assim esta variável e a FBN.

Estes resultados também foram observados por Campos e Lantmann (1998) e Araújo e Hungria (1999), em um estudo sobre nodulação e rendimento da soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii* e efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja respectivamente, onde obtiveram valores que chegaram a 42 unidades de nódulos por planta nas condições climáticas do Paraná nas localidades de Londrina, Ponta Grossa, e Campo Mourão.

No entanto, para os dados referentes ao tratamento com o inoculante *Azospirillum brasilense* este aumentou conforme o aumento da dose de N utilizada ($p < 0,05$), onde a quantidade do número de nódulos se mostrou maior na dose de 8% de N, com uma média de 317 nódulos por planta, mostrando que a adubação nitrogenada no ato da semente da soja aumentou a nodulação juntamente com a FBN.

Esses efeitos podem ocorrer através de vários mecanismos, que incluem a antecipação na FBN dos nódulos, aumento da matéria seca dos nódulos, promoção da ocorrência de nodulação através do aumento da formação de pêlos radiculares e raízes

secundárias (com aumento dos locais de infecção, inibição de fitopatógenos e produção de fitohormônios), bem como efeitos na partição da matéria seca entre raízes e brotos (Hungria et al., 2013; Galindo et al., 2017; Moretti et al., 2018).

Além disso, a nodulação sofre interferência dos teores de N existentes no solo, podendo o crescimento e a eficiência dos nódulos na fixação do N₂ não serem suficiente para suprir as necessidades da planta.

Esta variabilidade de resultados do número de nódulos entre as cultivares está relacionada a caracteres intrínsecos (genéticos) das cultivares avaliada conforme resultados encontrados por Bohrer e Hungria (1998), em um estudo sobre avaliação de cultivares de soja quanto a fixação biológica do nitrogênio. Esse fator pode ser explicado também devido a soja ter sido conduzida em condições controladas, com solo esterilizado e pela aplicação de N realizada em semeadura, que contribuiu significativamente para a formação e quantidade de nódulos na planta.

Para os valores de massa seca dos nódulos por planta, não houve diferença significativa, obtida nos tratamentos testados. Aratani et al. (2008) em seu estudo, verificaram que a adubação nitrogenada não prejudicou a nodulação nem interferiu na massa seca dos nódulos coletados no estágio de florescimento pleno. Assim, os resultados desse trabalho ressaltam a importância do manejo e época adequado de aplicação de N na soja, para que evite prejuízos para a FBN.

Para a massa seca da raiz (Figura 3) quando analisado o tratamento com o inoculante *Azospirillum brasilense*, observou-se interação significativa, onde a massa seca da raiz obteve valores médios de 10,25; 6,81; 7,86 e 23,42 g planta⁻¹ nas doses de 0 %, 2 %, 4 % e 8 % de N respectivamente ($p < 0,05$), ou seja, os menores valores de massa seca da raiz foram nas duas doses centrais conforme aumento da adubação nitrogenada, evidenciando que a aplicação de N interfere na produção de massa de raiz. Porém este caractere aumentou na dose de 8 % de N e superou à inoculações realizadas (ponto de mínima de 2,5 %).

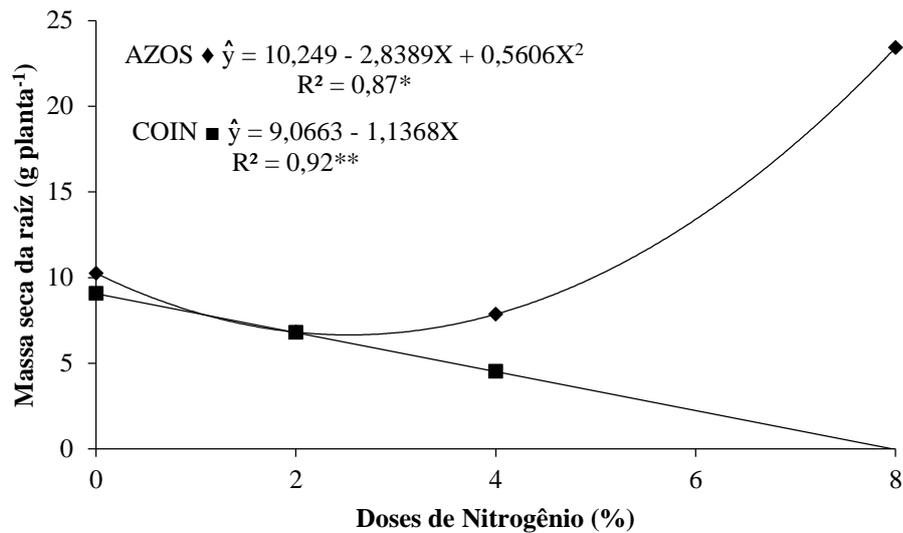


Figura 3. Massa seca da raiz de plantas de soja em função da inoculação com *Azospirillum brasilense*, co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Esse elevado incremento deve estar relacionado com a influência dessa bactéria sobre o crescimento das raízes de soja, pois além da FBN, a produção de fitormônios pode ter influenciado o crescimento de raízes laterais secundárias, permitindo maior associação com microorganismos benéficos e maior absorção de água e nutriente. Além de que essas respostas pode indicar que o *A. brasilense*, é tanto eficiente em fixar nitrogênio atmosférico, que o *B. japonicum* e a adubação com N em plantas de soja.

As bactérias associadas à raiz que beneficiam o crescimento de plantas são capazes de produzir auxina (AIA), o que gera um aumento no crescimento radicular e pode também contribuir para a formação de raízes laterais e pêlos radiculares. Com o crescimento das raízes, estas se tornam mais eficientes em absorver água e nutrientes (Dimpka et al., 2009).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal contribuem beneficemente para as plantas das seguintes maneiras: FBN e solubilização de fosfato inorgânico (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), produção de fitormônios (Brandl e Lindow, 1998) e agentes de controle biológico (May et al., 1997).

No entanto, no tratamento com a co-inoculação, a massa seca da raiz diminuiu conforme o aumento da dose de N aplicada. Isso significa que o N aplicado afetou o aumento da massa seca da raiz, onde diminuiu a ação das bactérias diazotróficas em associação e consequentemente diminuindo a atividade de FBN e crescimento radicular das plantas, logo,

essa diminuição de massa seca da raiz com o uso de dois microrganismos simultâneos pode acarretar competição entre ambos, sem alcançar a eficiência com a co-inoculação.

Bulegon et al. (2014) com o propósito de avaliarem o desempenho de *B. japonicum* e *A. brasilense*, de forma isolada e co-inoculada 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 co-inoculação não se mostrou eficiente frente à inoculação isolada das respectivas bactérias, em relação as cultivares testadas.

Para a massa seca da parte aérea, observou-se que para o tratamento sem inoculação, esta aumentou conforme o aumento linear da dose de N aplicada (Figura 4), ou seja, a inoculação com as bactérias diazotróficas não interferiram no acréscimo da massa seca da parte aérea ($p < 0,01$). Resultados semelhantes foram encontrado por Zilli *et al.* (2010), em seu estudo sobre a eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja, onde a aplicação de 200 kg ha^{-1} de N produziram maior massa seca de parte aérea ao inocular com *B. japonicum*.

Em um estudo sobre amendoim inoculado com estirpes de rizóbios em LATOSSOLO do cerrado matogrossense Cardinal de Almeida (2017), verificou que a testemunha nitrogenada não apresentou diferença significativa quando comparada aos tratamentos de inoculação para a massa seca da parte aérea das plantas de amendoim. Isso indica que possivelmente o fertilizante nitrogenado poderá ser parcialmente substituído pela inoculação com os rizóbios os quais podem proporcionar crescimento semelhante, mas com menor custo e maior sustentabilidade na produção.

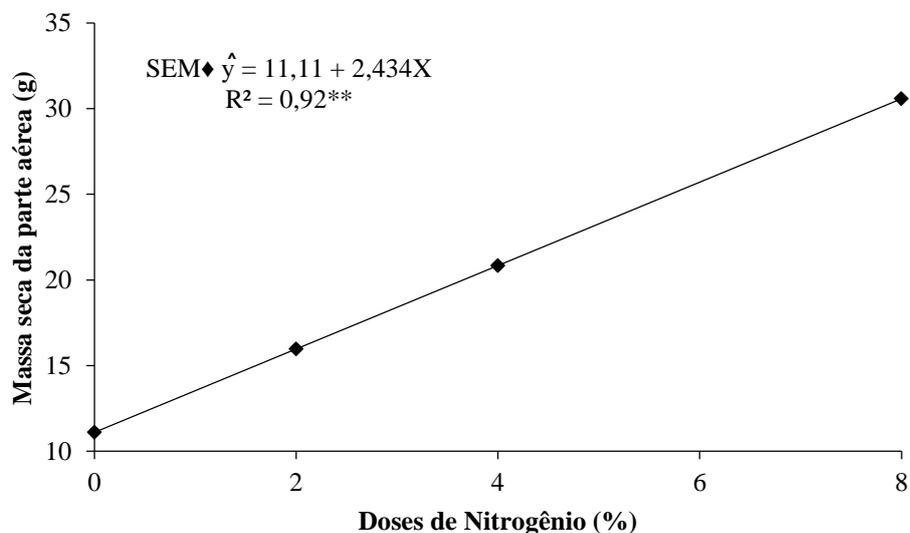


Figura 4. Massa seca da parte aérea de plantas de soja (R_1) em função das doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Para Barzotto (2015), em relação a doses de N a massa seca da parte aérea não apresentou diferenças significativas, porém, em tratamentos com uréia e uréia revestida de polímero, aplicados em superfície com doses de 45 e 90 kg ha⁻¹ e uma testemunha sem N, Barker et al. (2005), observaram efeitos significativos no estágio R_6 com a dose de 90 kg ha⁻¹. Outro experimento desenvolvido por três anos em Midsouthern (EUA), com altas doses de adubação nitrogenadas de 290, 310 e 360 kg ha⁻¹ em ambiente irrigado e não irrigado, Ray et al. (2006), observaram um aumento significativo no acúmulo de MS de 14 % e 17 %, aproximadamente, em relação aos dois tipos de ambientes.

Vale ressaltar que esta variável é importante para se obter resultados do teor de N presente no material vegetal, onde para que este seja avaliado é necessário que a massa seca da parte aérea seja triturada para que possa ser digerida e conseqüentemente destilada, para verificação do teor de N presente na folha.

Para o tratamento utilizando a inoculação com *B. japonicum*, obteve-se resposta linear decrescente do teor de N na planta conforme o aumento da dose de N aplicado ($p < 0,01$). Isso significa que a aplicação de N prejudicou a ação da bactéria, onde somente a mesma é capaz de suprir a necessidade do teor de N na folha. Para os demais tratamentos não houve diferença significativa, ou seja, qualquer um dos tratamentos seja com *A. brasilense*, com a co-inoculação ou aplicação de fertilizantes nitrogenados não irá ter efeitos superiores ao inoculante utilizado com a bactéria *B. japonicum*.

Para cardinal de Almeida (2017), mesmo não havendo efeito significativo das estirpes estudadas, sobre o teor de N na parte aérea do amendoim, os valores encontrados foram próximos aos observados nas testemunhas nitrogenada e absoluta. Segundo Pereira (2016), o teor de clorofila na folha é utilizado para predizer o nível nutricional de N em plantas, devido ao fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N na planta.

Fagan et al. (2007), verificaram que no estágio R_2 ocorre um alto acúmulo de matéria seca e nutrientes pela planta. Esse processo se inicia em folhas, hastes e raízes, começando a partir desse momento destinar parte dos nutrientes inclusive o N, para as flores e depois para vagens e sementes, diminuindo assim o teor de N nas folhas.

Como pode ser observado na figura 5, quando as sementes foram inoculadas com o *A. brasilense* a eficiência de nodulação teve aumento para a dose de N de 2 % com valores médios de 354 g kg⁻¹ (p<0,05), no entanto quando aumentou a dose para 4 % a eficiência de nodulação teve uma leve diminuição de 351 g kg⁻¹ (p<0,05), caindo drasticamente com aplicação de 8 % de N, prejudicando assim a eficiência de nodulação nas plantas.

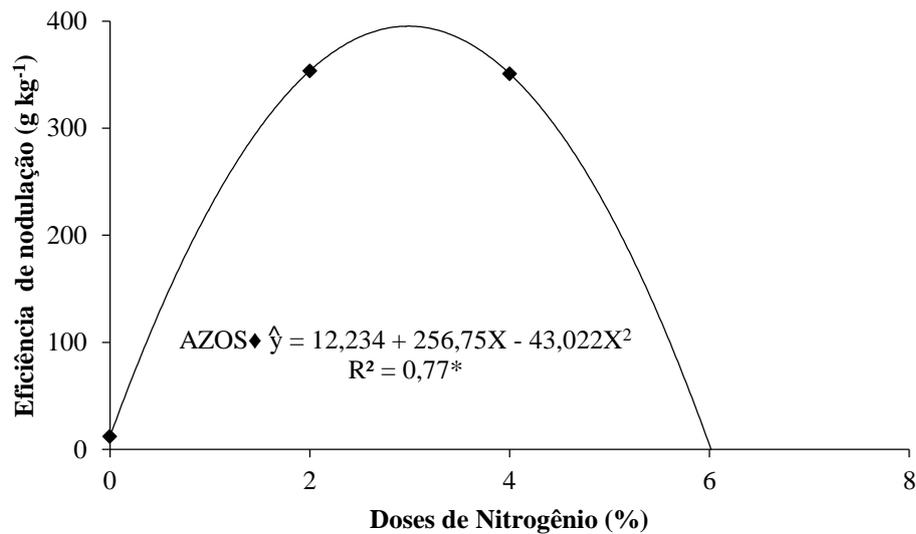


Figura 5. Eficiência de nodulação de plantas de soja em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Assim, a eficiência de nodulação explica os valores de nodulação utilizando a bactéria *A. brasilense*, provavelmente relacionado ao balanço de AIA, uma vez que esta possui maior superfície radicular facilitando a colonização por parte das bactérias proporcionando incremento na nodulação e maior aporte do N com o desenvolvimento da planta (Araújo et al., 2005).

Sobre o acúmulo de N na parte aérea de plantas de soja (Figura 6), submetidas a diferentes doses de N, o tratamento de co-inoculação se mostrou significativo (p<0,05) quando comparado aos outros tratamentos com as bactérias. Assim, o acúmulo de N na parte aérea aumentou conforme a aplicação de N, para o tratamento da co-inoculação, onde foi observado o valor máximo na dose de 8 % de N de 142 g kg⁻¹ de acúmulo de N na parte aérea. Isso significa que a baixa nodulação ocorrida nos tratamentos sem a inoculação e inoculação com *B. japonicum* pode ter influenciado no acúmulo de N na parte aérea, ou seja, grande parte

do N acumulado nas plantas cultivadas na casa de vegetação em estudo foi proveniente da FBN promovidos pela associação das bactérias, conforme o aumento da dose de N aplicado.

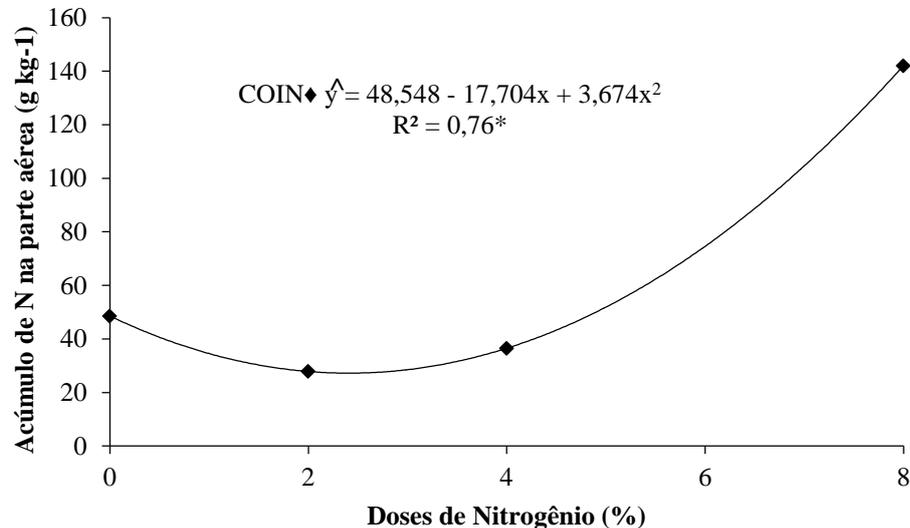


Figura 6. Acúmulo de nitrogênio na parte aérea de plantas de soja em função da co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Os resultados apresentados demonstram a capacidade das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, em estabelecer simbiose eficiente com a cultivar RK6316 IPRO em solos com e sem a elevada população rizobiana, proporcionando eficiência ao aumento da taxa de inoculação. Logo, somado ao N aplicado, o fertilizante nitrogenado pode ter contribuído intensamente para o desenvolvimento das plantas.

Em um estudo similar, Brito et al. (2011), avaliando os efeitos da adubação nitrogenada sobre a fixação simbiótica de N em feijão caupi, confirmaram a contribuição sinérgica entre o fertilizante nitrogenado, a fixação simbiótica e o N do solo para o acúmulo de N em plantas de feijão caupi.

Resultados semelhantes a esse estudo foram encontrados por Brito et al. (2009) em um estudo sobre a marcha de absorção do N do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de 15N, relatam que 93 % do N acumulado em planta de feijão-caupi foi derivado da FBN com estirpe BR 2001, quando aplicados 27 kg ha⁻¹ de N.

No referido estudo não houve diferenças significativas encontradas para a variável altura de plantas. Segundo Sedyama et al. (1989), fatores como temperatura, umidade,

fertilidade do solo, época de semeadura e densidade de plantas afetam a altura de planta, o grau de acamamento e a produtividade da cultura. No entanto, é preciso destacar que a altura das plantas de soja é uma característica geneticamente controlada (Verneti e Verneti Junior, 2009), ou seja, as variações no ambiente podem afetar a expressão gênica mas se a planta estiver em condições ótimas, deverá apresentar altura próxima à descrita para a variedade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2014), trabalhando com a cultivar Tatu de amendoim submetida à inoculação com rizóbios, os quais não observaram diferenças significativas entre a altura de plantas inoculadas e não inoculadas. Entretanto, Schossler et al. (2016), avaliando a influência da inoculação e co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *A. brasilense* em sementes de feijoeiro sobre a produtividade de grãos da cultura, observaram efeito significativo dos tratamentos com inoculações isoladas, assim como da co-inoculação de ambas as bactérias sobre a altura de plantas.

Quanto ao número de vagens por planta, não houve diferenças significativas encontradas entre os tratamentos estudados. Resultados semelhantes foram encontrados por Perusso (2013), estudando os componentes de rendimento da cultura da soja em função da aplicação de N no florescimento, verificou que não houve diferença entre os tratamentos, no entanto, as médias das vagens por planta foram superiores quando as plantas receberam alguma dose de N em cobertura, se comparadas às plantas sem aplicação de N.

Petter et al. (2012) investigando o efeito da adubação nitrogenada no início do florescimento sobre a produtividade e os componentes de produção na cultura da soja em solos do Cerrado, verificaram que o número de vagem por planta foi significativamente influenciado pela adubação nitrogenada tardia em todas as cultivares testados. Os autores observaram que as doses de 20 e 40 kg ha⁻¹ de N proporcionaram aumento no número de vagem por planta, enquanto que as doses de 80 e 160 kg ha⁻¹ de N reduziram esse número.

Sobre o número de grãos por vagem (Figura 7), para o tratamento com a co-inoculação, o mesmo diminuiu de forma linear conforme o aumento da dose de N, demonstrando assim que o número de grãos por vagem foi prejudicado conforme a utilização de fertilizante nitrogenado. Esse resultado é explicado em função da eficiência das bactérias em diferentes estádios fenológicos da cultura, onde entende-se que ambas bactérias possui efeito diferente em cada fase estudada.

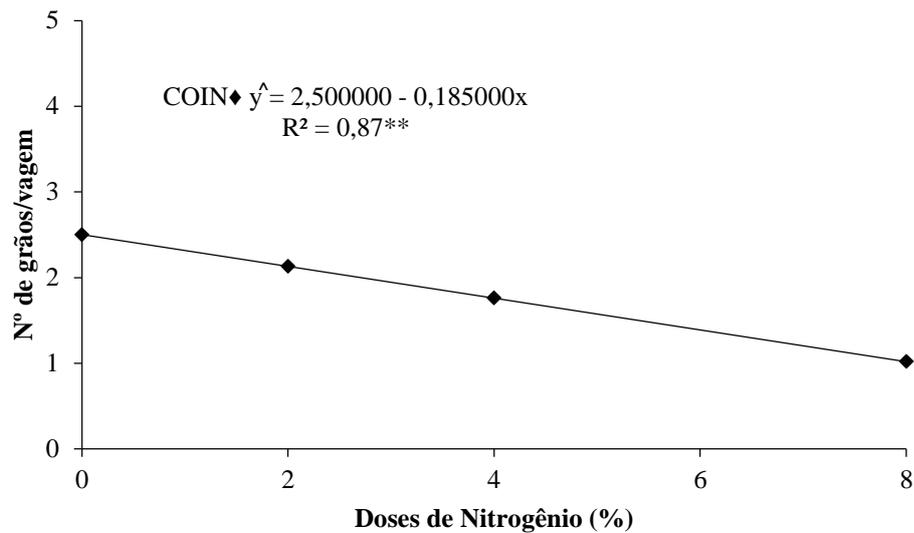


Figura 7. Número de grãos por vagens de plantas de soja em função da co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Diferente dos resultados encontrados por Perusso (2013) em um trabalho avaliando os componentes de rendimento da cultura da soja em função da aplicação de N no florescimento, onde, a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de grãos por vagem, estando de acordo com Thomas e Costa (2010), os quais sugerem que o número de grãos por vagem, dentre os componentes, é o que apresenta menor variação, sendo que isso foi evidenciado em vários trabalhos, demonstrando uma uniformidade do melhoramento na busca de plantas com produção de, em média, dois grãos por vagem.

Não foram constatadas diferenças significativas de produtividade no uso da inoculação com as bactérias e aplicação de diferentes doses de N nas condições estudadas, sendo que a produtividade média foi de $137,54 \text{ g planta}^{-1}$.

3.4 CONCLUSÕES

Não houve interação significativa entre as inoculação e doses de N para massa seca dos nódulos, altura de plantas, número de vagem por planta e produtividade de grãos nas condições estudadas. O número de nódulos e massa seca de raiz da soja se mostrou maior na dose de 8 % de N, com uma média de 317 nódulos por planta e $23,42 \text{ g planta}^{-1}$, inoculadas com o *A. brasilense*. A eficiência de nodulação obteve maior valor (354 g kg^{-1}) quando utilizada a dose de 2 % de N.

O acúmulo de N na parte aérea apresentou melhor valor na dose de 8 % de N e alcançando 142 g kg¹ quando realizou-se a co-inoculação, indicando capacidade de respostas diferentes para os caracteres massa seca de raiz e número de grãos por vagem. A prática de adubação nitrogenada resultou no aumento do número de nódulos apenas da bactéria *A. brasilense* e ganhos significativos de N na planta somente na dose de 8 % de N.

3.5 REFERÊNCIAS

Alcântara RMCM, Xavier GR, Rumjanek NG, Rocha MM, Carvalho JS. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. Rev Cienc Agro. 2014; 45: 1-9. <http://dx.doi.file:///H:/2503-14562-1-PB>

Almeida JVA. Polêmica do uso de nitrogênio em soja. Laborsolo academy: 3. ed; 2015 [citado 2019 Out 18]. Disponível em: <http://www.doutoresdaterra.com.br/plantas/a-polemica-do-uso-de-nitrogenio-em-soja>

Aratani RG, Lazarini E, Maques RR, Backes C. Adubação nitrogenada em soja na implantação do sistema de plantio direto. Biosci J. 2008; 24:31-38. <http://dx.doi.http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6755/4457>

Araújo ASF, Teixeira GM, Campos AX, Silva FC, Ambrosano EJ, Trivelin PCO. Utilização de nitrogênio pelo trigo cultivado em solo fertilizado com adubo verde (*Crotalaria juncea*) e/ou uréia. Cienc Rural. 2005; 35: 284-289. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000200006>

Araújo FF, Hungria M. Nodulação e rendimento da soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. Brasília: Pesq Agrop Brasi; 1999; [citado 2019 Out 18]. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/16490/1/PAB97284.pdf>.

Barker DW, Sawyer JE. Nitrogen application to Soybean at Early Reproductive Development. Agro J. 2005; 97: 615-619. DOI: 10.2134 / agronj2005.0615

Barzotto F. Nitrogênio e água como fatores de produtividade da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2015.

Bohrer TRJ, Hungria MA. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. Brasília: Pesq Agrop Bras; 1998 [citado 2019 Out 18]. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47122/1/AVALIACAO-DE-CULTIVARES-DE-SOJA-QUANTO-A-FIXACAO.pdf>

Brandl MT, Lindow SE. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. Califónia: Appl Environ Microbiol. 1998 [citado 2019 Nov 12]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726868>. Pdf.

Bremner JM, Breitenbeck GA. A simple steam distillation method for determination of ammonium in semimicro-Kjeldahl analysis of soil and plant materials using a block digester. Comm. Soil Sci. Plant Anal., 14:905- 914, 1983.

Brito MMP, Muraoka T, Silva EC. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. Brag, 2011; 70:206-215. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000100027>

Brito, MMP; Muraoka, T; Silva, EC. Marcha de absorção de nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de 15N. Rev. Bras. de Cienc do Solo, 2009; 33: 895-905. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000400014>

Bulegon LG, Klein J, Rampim L, Guimarães VF, Battistus AG, Kestring D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. Umuarama: Jof Agron Sci; 2014 [citado 2019 Nov 15]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273364695_INITIAL_DEVELOPMENT_OF_SOY_BEAN_SEEDLING_INOCULATED_AND_CO-INOCULATED_WITH_Bradyrhizobium_japonicum_AND_Azospirillum_brasilense

Brum MS, Cunha VS, Stecca JDL, Grandó LFT, Martin TN. Components of corn crop yield under inoculation with *Azospirillum brasilense* using integrated crop-livestock system. Acta Sci Agron, 2016; 38: 485-492. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30664>

Campos RJ, Lantmann AF. Efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. Brasília: Pesq Agrop Bras, 1998 [citado 2019 Nov 04]. Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4956/7093>.Pdf.

Cardinal de Almeida MS. Amendoim inoculado com estirpes de rizóbio em latossolo do cerrado matogrossense [Dissertação]. Rondonópolis: Universidade Federal de Mato Grosso; 2017.

Cavallet L, Pessoa ACS, Helmich JJ, Helmich PR, Ost CF. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* Revi Bras Eng Agríc Ambient. 2000; 4: 129-132. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662000000100024>

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília. Conab; 2019

Corassa GM, Bertollo GM, Gallon M, Bona SD, Santi AL. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada em trigo na região norte do Rio Grande do Sul. Goiânia: Enc Biosf, 2013 [citado 2019 Out 19]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/264992894_INOCULACAO_COM_Azospirillum_brasilense_ASSOCIADA_A_ADUBACAO_NITROGENADA_EM_TRIGO_NA_REGIAO_NORTE_DO_RIO_GRANDE_DO_SUL.pdf.

Dimpka C, Weinand T, Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant Cell Environ. 2009; 32: 1682- 1694. doi: 10.1111 / j.1365-3040.2009.02028.x

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistema brasileiro de classificação de solos. 3. ed. Rio de Janeiro: Revista e ampliada; 2013.

Fagan EB, Sandro LPM, PA, Mafron PA, Casaroli D, Simon J, Neto DD, Lier QJV, Santos, OS, Muller L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja: revisão. Rio Grande do Sul: Rev da FZVA; 2007 [citado 2019 Out 21]. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2481/1940>

Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis. Ciênc Agrotec. 2011; 35: 1039-1042.

Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria MA. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. Amb Express. 2016; 6: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>

Galindo FS, Filho MCM, Buzetti S, Santini JMK, Ludkiewicz MGZ, Baggio G. Modes of application of cobalt, molybdenum and *azospirillum brasilense* on soybean yield and

profitability. Rev Bras Eng Agric Ambi. 2017; 21:180-5. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n3p180-185>

García Oliveras JC, Mendoza HA, Mayek PN. Efecto de *Azospirillum brasilense* em el rendimento del maíz em el norte de tamaulipas, México. México: Univer y Cienc; 2012 [citado 2019 Out 20]. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n1/v28n1a8.pdf>

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja; 2001 [citado 2019 Out 20]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and a lipoferum improves yields of maize and wheat in brazil. plant and soil. 2010; 331: 413–425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. Co-inoculation of soybeans and common beans with *rhizobia* and *azospirilla*: strategies to improve sustainability. Biol Fertil Soils. 2013; 49: 791-801. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environ Microbiol. 2004; 6: 1244–1251. DOI: 10.1111 / j.1462-2920.2004.00658.x

Kws. Parcerias que semeiam o crescimento. Patos de Minas: KWS; 2009 [citado 2019 Out 14]. Disponível em: <https://www.kws.com/br/pt/produtos/soja/portfolio-completo-soja/rk6316-ipro/>

Martinez SB, Pomés J, Mais MA, Chale W, Benedette de JP, Gabi M. Production and response to *Azospirillum brasilense* inoculation in two globe artichoke hybrids. Acta Horti. 2016; 1147: 213-216. 10.17660/ActaHortic.2016.1147.31

May R, Völksch B, Kampmann G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. Micr Ecológ. 1997; 34: 118-124. <https://doi.org/10.1007/s002489900041>

Melo RSde, Zilli JE. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o estado de Roraima. *Pesq Agropec Bras.* 2009; 44: 1177-1183. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900016>

Milléo MVR, Pereira IC. Avaliação da eficiência agronômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. *Rev Sci Agra.* 2016; 17: 14- 23. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v17i3.44630>

Morais Tpde, Brito CHde, Brandão AM, Rezende WS. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Rev Ciênc Agro.* 2016; 47: 290-298. <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/3001>

Moretti, LG et al. Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield? *Agron Jour.* 2018; 110:715-21. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0540>

Pereira MTT. Clorofilometria por imagem digital aplicada à cultura do milho (*Zea mays* L.) [dissertação]. Chapecó: Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó); 2016.

Perusso LP. Componentes de rendimento da cultura da soja em função da aplicação de nitrogênio no florescimento [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2013.

Petter FA, Pacheco LP, Neto FdeAN, Santos GG. Respostas de cultivares de soja à adubação nitrogenada tardia em solos de Cerrado. Mossoró: *Revista Caatinga*; 2012 [citado 2019 Nov 12]. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/2137/pdf>.

Ray DJ, Heatherly LG, Fritschi FB. Influence of large amounts of nitrogen on non irrigated and irrigated soybean. *Crop Sci.* 2006; 46: 52-60. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2005.0043>

Repke RA, Cruz SJS, Silva Cjda, Figueiredo PG, Bicudo SJ. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. *Rev bras de milho e sorgo.* 2013; 12: 214-226. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v12n3p214-226>

Santos CCD, Guimarães SL, Farias LN, Bonfim-Silva EM, Polizel A C. Crescimento inicial de plantas de amendoim inoculadas com rizóbio isolado de feijão caupi. Goiânia: *Enc Biosf*;

2014 [citado 2019 Out 22]. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/crescimento%20inicial.pdf>

Schossler JH, Rizzardi DA, Michalovicz. Componentes de rendimento e produtividade do feijoeiro comum submetido à inoculação e co-inoculação com estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*. Rev Sci Agra. 2016; 17: 10-15. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v17i1.47409>

Sediyama T, Pereira MG, Sediyama CS, Gomes JLL. Cultura da soja: 1ª parte. Viçosa: UFV; 1989.

Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. Porto alegre: Artmed; 2009.

Teixeira Filho MCM, Buzetti S, Andreotti M, Arf O, Benett CGS. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto. Pesq Agropec Bras. 2010; 45: 797-804. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000800004>

Thomas AL, Costa JÁ. Desenvolvimento da planta de soja e potencial de rendimento de grãos. In: Thomas, AL, Costa JÁ, editores. Soja: manejo para alta produtividade de grãos. Porto Alegre: Evangraf; 2010. p. 15-30.

Verneti FJ, Verneti junior FJ. Genética da soja: caracteres qualitativos e diversidade genética. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2009.

Zilli JE, Campo RJ, Hungria M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. Pesq agropec bras. 2010; 45: 335-338. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000300015>

4 ARTIGO 2. CARACTERES AGRONÔMICOS DA SOJA EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO, CO-INOCULAÇÃO E DOSES DE N EM LATOSSOLO VERMELHO EUTROFÉRICO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os caracteres agronômicos da soja em função da inoculação, co-inoculação e doses de N em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 4x4, sendo quatro tipos de inoculação (sem inoculação, inoculação da bactéria *B. japonicum*, inoculação da bactéria *A. brasilense* e inoculação das *B. japonicum* e *A. brasilense* em associação) e quatro doses de N (0 = 0; 2 = 4,5; 4 = 9 e 8 % = 18 kg ha⁻¹), com quatro repetições. Foram realizadas avaliações no período da floração (estádio R₁), e na maturação plena (estádio R₉). Não foram constatadas diferenças significativas para os caracteres altura de plantas, número de vagem por planta, número de grãos por vagem, acúmulo de nitrogênio na planta e produtividade de grãos nas condições estudadas. A média do número de nódulos mostrou-se maior na dose de 2 % de N equivalentes a 46 nódulos por planta quando inoculada com *B. japonicum*, e nas variáveis de massas seca de nódulos, raiz e parte aérea quando inoculado com *A. brasilense* na dose de 8% obtiveram maiores médias com 486,94 mg planta⁻¹, 11,91 g planta⁻¹, 95,5 g planta⁻¹, respectivamente. A eficiência de nodulação teve aumento linear quando utilizada a dose de 8 % de N com valor de 72,32 g kg⁻¹. Para os caracteres número de nódulos e eficiência de nodulação, houve aumento significativo destes quando utilizada a dose de 2 % de N, associado a pratica de adubação nitrogenada. Utilizando as doses de 8 %, a massa seca de nódulos, raiz, parte aérea e eficiência de nodulação, obteve resultados mais satisfatórios que as demais doses.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium japonicum*. Nódulos. Eficiência de nodulação.

AGRONOMIC CHARACTERS OF SOY AS A FUNCTION OF INOCULATION, CO-INOCULATION AND NITROGENATED FERTILIZATION IN EUTROFERRICO RED LATOSOL

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the agronomic traits of soybean as a function of inoculation, co-inoculation and N doses in Eutropheric RED LATOSOL. The experimental design used was a randomized block in a 4x4 factorial scheme, with four types of inoculation (without inoculation, inoculation of the bacterium *B. japonicum*, inoculation of the bacterium *A. brasilense* and inoculation of *B. japonicum* and *A. brasilense* in association) and four doses of N (0 = 0; 2 = 4.5; 4 = 9 and 8 % = 18 kg ha⁻¹), with four replications. Evaluations were carried out during the flowering period (stage R₁), and at full maturity (stage R₉). No significant differences were found for the characters plant height, number of pods per plant, number of grains per pod, nitrogen accumulation in the plant and grain yield in the studied conditions. The average number of nodules was higher at a dose of 2 % N equivalent to 46 nodules per plant when inoculated with *B. japonicum*, and in the dry mass variables of nodules, roots and shoots when inoculated with *A. brasilense* in the dose of 8 % obtained higher averages with 486.94 mg plant⁻¹, 11.91 g plant⁻¹, 95.5 g plant⁻¹, respectively. The nodulation efficiency increased linearly when the dose of 8% N was used, with a value of 72.32 g kg⁻¹. For the characters number of nodules and nodulation efficiency, there was a significant increase when the dose of 2 % N was used, associated with the practice of nitrogen fertilization. Using the doses of 8 %, the dry mass of nodules, roots, shoots and nodulation efficiency, obtained more satisfactory results than the other doses.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*. Nodules. Nodulation efficiency.

4.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma das mais importantes culturas oleaginosas do mundo. A estimativa da produção de grãos no Brasil da safra 2018/19 é de 242,1 milhões de toneladas, apresentando variação positiva de 6,4 % em relação à safra passada, representando aumento na produção de 14,5 milhões de toneladas (Conab, 2019).

Atualmente, a cultura da soja vem mantendo a tendência de crescimento na área cultivada. No Paraná, o rendimento médio alcançado foi de 2.989 kg ha⁻¹ e a produção final ficou em 16,25 milhões de toneladas, na safra 2018/19 (Conab, 2019). Porém na safra atual

2019/2020 a área plantada com a oleaginosa totalizou aproximadamente 5,48 milhões de hectares, com estimativa de produtividade de 3.598 kg ha⁻¹, sendo que a produção total obteve incremento de 21,25 % (Conab, 2020).

A cultura da soja é exigente em vários nutrientes para um bom desenvolvimento, e dentre eles o N é o mais requerido (Hungria e Campo, 2000). O fornecimento do N pode ser realizado de três formas: mineral, orgânica e pela FBN (Hungria et al., 2001).

Na busca de minimizar a contaminação ambiental, elevando a qualidade dos alimentos, reduzindo a dependência de adubos químicos e com baixo custo, dá-se enfoque a substituição de insumos minerais por microrganismos (Hungria, 2011). Dentre eles, a FBN é a mais comumente adotada no Brasil e assume extrema importância visto que é capaz de suprir toda a exigência de nitrogênio pela soja ao longo do ciclo de cultivo, dispensando totalmente a necessidade de qualquer insumo químico (Rolas, 2004).

Nas condições tropicais brasileiras, o processo de FBN através da simbiose com *Bradyrhizobium* pode fornecer todo o N que a soja necessita, desde que respeitados os procedimentos para uma adequada nodulação. A recomendação para o cultivo de soja é a utilização de inoculante sem a suplementação com fertilizante nitrogenado, ou de até 20 kg ha⁻¹ na semeadura (Embrapa, 2011). No entanto, a adubação nitrogenada para a cultura da soja é tema muito polêmico dentro da comunidade científica (Sediyama, 2016).

Alguns estudos reportaram que o uso de fertilizantes nitrogenados, em doses superiores a 20 kg ha⁻¹ de N, pode reduzir a nodulação e a eficiência da FBN, e não melhora o desempenho produtivo da cultura (Hungria et al., 2006b; Aratani et al., 2008; Kaschuk et al., 2016). Por outro lado, pesquisas realizadas demonstraram que adubação nitrogenada pode melhorar o desenvolvimento e a produtividade da cultura da soja (Barranqueiro e Dalchiavon, 2017; Moreno et al., 2018). Araújo e Carvalho (2006) comentaram que em algumas situações, como em áreas de primeiro cultivo de soja, onde não existem populações de rizóbio no solo, a aplicação de baixas doses de N na semeadura (20 a 30 kg ha⁻¹ de N) deve ser recomendada com a finalidade de disponibilizar N às plantas até o início da nodulação. Portanto, tem-se disseminado, no Brasil, que a soja necessita de uma adubação nitrogenada de “arranque”, para suprir uma eventual deficiência de N durante a fase inicial da cultura, que ainda não foi infeccionada pelas bactérias *B. japonicum* (Almeida, 2015).

Uma alternativa promissora explorada no Brasil é a mistura de inoculantes oficialmente recomendados para a soja com outras bactérias promotoras de crescimento ou bactérias associativas, uma técnica definida como co-inoculação (Hungria et al., 2013). Esta metodologia vem sendo adotada por apresentar boa produtividade e resultados melhores que

cada estirpe isolada. Além de contribuir para aumento da nodulação, ela tem um ótimo efeito no crescimento radicular e pode ser utilizado tanto na semente quanto no sulco de semeadura (Hungria et al., 2013). A co-inoculação é muito utilizada e estudada em outros países por apresentar uma ótima produtividade comparada à técnica padrão (Atieno et al., 2012). Porém, apesar de a técnica apresentar altos rendimentos conforme os estudos observados acima, no Brasil ela ainda não é muito explorada.

Assim, entende-se que a fixação simbiótica é um processo essencial para o cultivo da soja, onde estudos com a adubação mineral, inoculação de bactérias *B. japonicum*, e co-inoculação com *A. brasilense*, devem ser estudados com mais frequência, para que assim possa ter-se novos resultados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os caracteres agronômicos da soja em função da inoculação, co-inoculação e doses de N em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e condução do experimento

O experimento foi implantado e conduzido na Safra 2018/19, em área experimental da Cooperativa Agroindustrial (COPAGRIL), situada na cidade de Marechal Cândido Rondon - PR, localizado nas coordenadas 24°33'24''S de latitude e 54°3'24''W de longitude e altitude de 420 metros acima do nível do mar. Os dados meteorológicos foram coletados periodicamente (Figura 1).

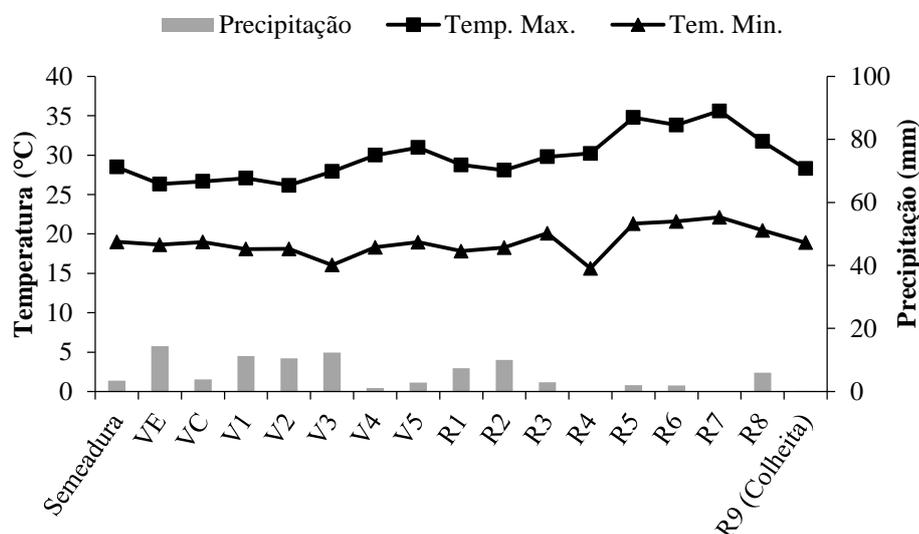


Figura 1. Dados médios de temperaturas máxima e mínima (°C) e precipitação (mm) registrados durante a condução do experimento, de acordo com os estádios fenológicos da cultura da soja, Marechal Cândido Rondon - PR, 2020.

O solo da região é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de textura argilosa (Embrapa, 2013). Antes da instalação do experimento foi realizada coletas de solo nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm, em seguida procedeu-se a análise química do solo no Laboratório de Química Ambiental e Industrial, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), e foi caracterizado quimicamente, cujos resultados foram: M.O. = 28 g dm⁻³; P = 14 mg dm⁻³; pH em CaCl₂ = 5,68; K, Ca, Mg, H + Al, respectivamente, 0,10; 2,40; 1,40; 3,29 cmol_c dm⁻³; T = 7,19 cmol_c dm⁻³ e V = 54,22 %.

Para realização do experimento, foi utilizado uma área de 1.296 m². As parcelas tinham como dimensões: 6,0 m de comprimento e 3,0 m de largura, onde foram compostas por 5 linhas contendo 5 metros de comprimento cada e espaçadas por 0,5 m, caracterizando uma unidade experimental de 18 m². A área útil da parcela foi composta pelas duas linhas centrais desprezando-se 0,5 m das extremidades das parcelas. A semeadura foi realizada no dia 02 de outubro de 2018, sendo o milho cultivado anteriormente.

4.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizado em esquema fatorial 4x4, sendo quatro tipos de inoculação (sem inoculação, inoculação da bactéria *B. japonicum*, inoculação da bactéria *A. brasilense* e inoculação das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em associação) e quatro doses percentuais de N (0 = 0; 2 = 4,5; 4 = 9 e 8 % = 18 kg ha⁻¹), com quatro repetições, totalizando 16 tratamentos, sendo: T₁ - Sem inoculação + 0 % de N (testemunha); T₂ - Sem inoculação + 2 % de N; T₃ - Sem inoculação + 4 % de N; T₄ - Sem inoculação + 8 % de N; T₅ - Inoculação com *B. japonicum* + 0 % de N; T₆ - Inoculação com *B. japonicum* + 2 % de N; T₇ - Inoculação com *B. japonicum* + 4 % de N; T₈ - Inoculação com *B. japonicum* + 8 % de N; T₉ - Inoculação com *A. brasilense* + 0 % de N; T₁₀ - Inoculação com *A. brasilense* + 2 % de N; T₁₁ - Inoculação com *A. brasilense* + 4 % de N; T₁₂ - Inoculação com *A. brasilense* + 8 % de N; T₁₃ - Co-inoculação + 0 % de N; T₁₄ - Co-inoculação + 2 % de N; T₁₅ - Co-inoculação + 4 % de N e T₁₆ - Co-inoculação + 8 % de N. Para os tratamentos com a adubação nitrogenada, foram utilizados 46 g dos formulados contendo NPK 0-20-20, 2-20-20, 4-20-20 e 8-20-20, correspondendo a 0, 2, 4 e 8 % de N respectivamente, aplicados na linha de semeadura.

4.2.3 Implantação do experimento

A cultivar de soja utilizada no estudo foi a RK6316 IPRO com a tecnologia INTACTA RR2 PROTM, a qual apresenta grupo de maturação de 6.3, com características singulares tais como: hábito de crescimento indeterminado, flexibilidade de épocas e ambientes de plantio com alto potencial produtivo, apresenta ótima arquitetura de plantas com resistência ao acamamento, sistema radicular agressivo, ciclo favorecendo o plantio da segunda safra antecipada, alto teto produtivo com resposta ao investimento, além de uma excelente adaptabilidade de clima, solo e de região (Kws, 2009).

Os inoculantes utilizados para a soja foi o Nitro 1000 líquido constituído por bactérias da espécie *B. japonicum* estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080, e o inoculante líquido constituído por bactérias da espécie *A. brasilense* estirpe AbV5 + AbV6, ambos inoculantes com recomendação de utilização de 100 mL para 50 kg de sementes. A mistura foi realizada em um recipiente plástico, simulando a operação de tratamento industrial com inoculadora, no momento da semeadura (semeadura direta), até chegar à homogeneidade das sementes. Durante a condução do experimento realizou-se tratamentos culturais como a capina entre as linhas e parcelas. Realizou-se também o manejo fitossanitário da cultura, onde procedeu-se o controle no estágio R3 para o controle do percevejo verde (*Nezara viridula* L.) através do monitoramento, com realizações de aplicações do ingrediente ativo Deltametrina (piretroide) na dosagem recomendada pelo fabricante: 300 mL ha⁻¹, ajudando assim na diminuição de ataques de pragas e doenças na cultura.

4.2.4 Variáveis analisadas

Foram realizadas avaliações no período da floração (estádio R₁), para determinar os componentes de nodulação e o teor e acúmulo de N na planta; e na maturação plena (estádio R₉) para avaliar os caracteres agronômicos da cultura.

4.2.5 Componentes de Nodulação

As plantas foram colhidas no estágio R₁, para avaliar os componentes de nodulação, tais como: número de nódulos, massa da matéria seca dos nódulos; massa da matéria seca da parte aérea; massa da matéria seca da raiz; eficiência de nodulação; teor de nitrogênio na parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Para a determinação do número de nódulos as plantas foram levadas ao laboratório onde foram separadas em raiz e parte aérea. Em seguida as raízes foram lavadas

cuidadosamente sobre peneira para evitar perda de nódulos, onde os mesmos, foram destacados das raízes, para determinação do número de nódulos e massa seca dos nódulos, de acordo com Alcântara et al. (2014). Posteriormente fez-se a contagem de cada nódulo presente nas raízes individuais de cada planta, com o auxílio de um contador manual.

4.2.6 Determinação da massa seca dos nódulos, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz

Posteriormente os nódulos foram acondicionados em sacos de papel e levados a estufa, com circulação forçada de ar, mantida à temperatura de 65 °C por 72 horas. Após esfriar em dessecador, cada repetição foi pesada em balança com precisão de 0,001 g (Hungria et al., 2001). Os resultados foram expressos em g por planta. O mesmo procedimento foi realizado com as plantas e raízes para designar a massa seca da parte aérea e massa seca da raiz.

4.2.7 Teor de Nitrogênio e Eficiência de Nodulação

Após seco em estufa o material foi moído para análise do teor de N total. O conteúdo de N foi determinado a partir de materiais vegetais moídos pelo método de Kjeldahl, de acordo com Bremner (1983), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea. O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N (%) e dividindo por 100 e a eficiência de nodulação foi determinada dividindo-se o N total da parte aérea pela massa seca de nódulos (Melo e Zilli, 2009).

4.2.8 Caracteres Agronômicos

Na fase de maturação plena (R₉) da cultura foram avaliadas plantas para obter resultados equivalentes aos caracteres agronômicos, tais como: altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e rendimento de grãos. A população de plantas foi determinada de três contagens do número de planta por metro linear dentro da parcela. A colheita de plantas procedeu-se manualmente no dia 18 de fevereiro de 2019.

Antes da colheita realizou-se a medição da altura de plantas, onde foi medida da superfície do solo ao ápice da planta utilizando-se uma fita métrica graduada, e após a colheita procedeu-se a contagens do número de vagens por planta e número de grãos por vagem conforme a quantidade obtida por planta. A determinação da massa de 1000 grãos foi realizada pela contagem e pesagem de 1000 grãos e o rendimento médio foi determinado a

partir da pesagem de grãos da unidade experimental com umidade corrigida para 14 % (Alcântara et al., 2014).

4.2.9 Análise estatística

Os dados de nodulação, teor e acúmulo de N e caracteres agronômicos foram submetidos à análise de variância e regressão com *software* SISVAR, ao nível de 5% de probabilidade de erro (Ferreira, 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o número de nódulos (Figura 2) quantificados referentes a bactéria de *B. japonicum* e a co-inoculação, apresentou efeito significativo ($p < 0,01$), com valores baixos, onde na dose 0 % de N quantificou-se uma média de 12 e 4 nódulos, sendo encontrados maiores valores do número de nódulos quando utilizada a dose de 2 % de N com uma média de 46 e 45 nódulos por planta respectivamente. A média da população de plantas foi de 14 plantas por metro, sendo que esta não houve efeito significativo para a mesma.

No entanto, verificou-se queda do número de nódulos nas doses de 4 e 8 % de N aplicados na interação com ambas bactérias, dessa forma, as doses de N na semeadura, associado a efeitos de temperatura (Figura 1) e influência do pH do solo, culminaram na inibição da infecção da bactéria e, conseqüentemente, na formação do número de nódulos por plantas ao incrementar as doses de N.

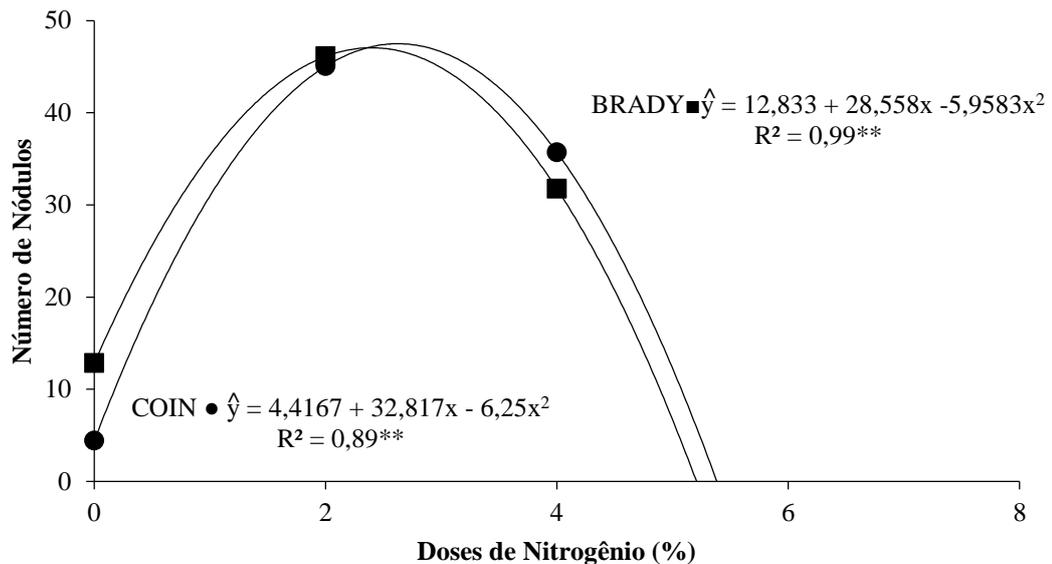


Figura 2. Número de nódulos de raízes de soja em função da inoculação com *B. japonicum*, co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

A formação e desenvolvimento de nódulos, bem como o tamanho dos mesmos, podem ser influenciados positivamente por vários fatores, dentre estes o crescimento do sistema radicular. Segundo Bárbaro (2009) o maior crescimento do sistema radicular, possibilita maior capacidade de formação de nódulos, onde a co-inoculação reflete no tamanho dos nódulos formados, possibilitando expressar seu máximo potencial em fixar N.

Trabalho realizado por Gitti (2015), demonstra que sementes de soja inoculadas e co-inoculadas a base de *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense*, influenciaram positivamente no incremento de nódulos por planta, obtendo média de 88,4 nódulos por planta. Tal resultado se demonstrou superior em relação aos demais tratamentos. A inoculação de sementes na cultura da soja é uma prática excelente e precisa ser fomentada no cultivo dessa leguminosa, uma vez que a população de bactérias eficientes na FBN pode ser reduzida no período de entressafra de soja, devido à competição por microrganismos nativos do solo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Campos e Lantmann (1998) e Araújo e Hungria (1999), os quais autores obtiveram valores que chegaram a 42 unidades de nódulos por planta nas condições climáticas do Paraná, corroborando com os dados encontrados neste estudo.

Para Prando et al. (2019), em um trabalho sobre a co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná, a nodulação média foi de 20,8

nódulos planta⁻¹ nas parcelas co-inoculadas e 15,5 nódulos planta⁻¹ nas não inoculadas, tendo um aumento de 34%. Já Nogueira et al. (2018) constataram aumento médio de 33,3% no número de nódulos plantas⁻¹ co-inoculadas com *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* em relação às não inoculadas. Além disso, a co-inoculação resultou em precocidade de nodulação, o que favorece o estabelecimento da cultura.

Com relação a massa seca dos nódulos (Figura 3), verificou-se aumento da mesma de acordo com o aumento das doses de N utilizadas para os tratamentos sem inoculação ($p < 0,05$), inoculação com *A. brasilense* ($p < 0,01$), e a co-inoculação ($p < 0,05$). No entanto, os dados referentes ao tratamento utilizando a bactéria *A. brasilense* sobressaiu-se mais que os demais, obtendo assim maiores valores de massa seca dos nódulos nas doses de 0 % (137,4 mg planta⁻¹) e 8 % de N (486,94 mg planta⁻¹), apresentando uma leve diminuição nas duas doses centrais. Isso significa que a adubação nitrogenada pode ter influenciado na redução desse caractere, se mostrando menos eficaz quando comparado aos demais resultados desse tratamento.

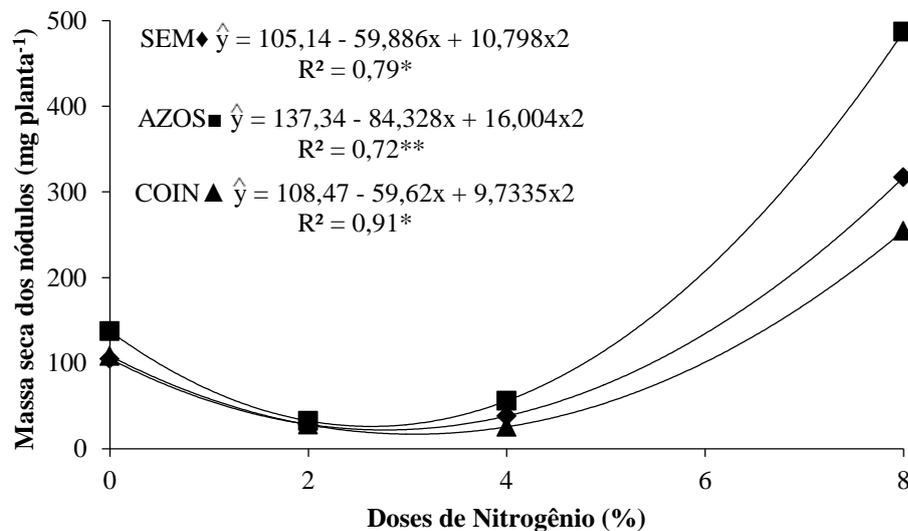


Figura 3. Massa seca dos nódulos de raízes de soja em função da ausência de inoculação, inoculação com *A. brasilense*, co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Estes resultados estão bem acima dos encontrados por Campos e Lantmann (1998), os quais obtiveram média de 67 mg planta⁻¹ de massa da matéria seca dos nódulos no Estado do Paraná, em seu estudo sobre efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. Araújo e Hungria (1999) estudando a nodulação e rendimento da soja

co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*, obtiveram média de 140 mg planta⁻¹ de massa da matéria seca dos nódulos, valores próximos aos encontrados no presente trabalho, demonstrando não haver restrições para o desenvolvimento da nodulação.

Resultado inverso foi encontrado por Zuffo et al. (2019), em um trabalho sobre a adubação nitrogenada na soja inibe a nodulação e não melhora o crescimento inicial das plantas, onde verificou-se que houve inibição da matéria seca dos nódulos com a aplicação das doses de N. Tais resultados corroboram aos verificados por Hungria et al. (2006b), os quais verificaram que a adubação nitrogenada inibiu a massa seca dos nódulos na cultura da soja.

No tratamento com a bactéria *B. japonicum*, a massa seca da raiz teve um pequeno aumento até a dose de 2 % de N (2,90 g), diminuindo drasticamente quando aplicadas as doses de 4 e 8 % de N (Figura 4). Isso significa que a aplicação de N diminui a atividade de FBN e crescimento radicular das plantas, quando utilizadas em associação à bactéria estudada, acarretando na diminuição da massa seca de raiz.

No entanto, observou-se comportamento inverso para o tratamento com o inoculante *A. brasilense*, onde a massa seca da raiz obteve valores médios de 4,25; 2,33; 2,97 e 11,91 g planta⁻¹ nas doses de 0, 2, 4 e 8 % de N respectivamente (p<0,01), ou seja, os menores valores de a massa seca da raiz foram nas duas doses centrais conforme aumento da adubação nitrogenada, evidenciando que a aplicação de N interfere na produção de massa de raiz. Porém este caractere aumentou na dose de 8 % de N e superou à inoculações realizadas.

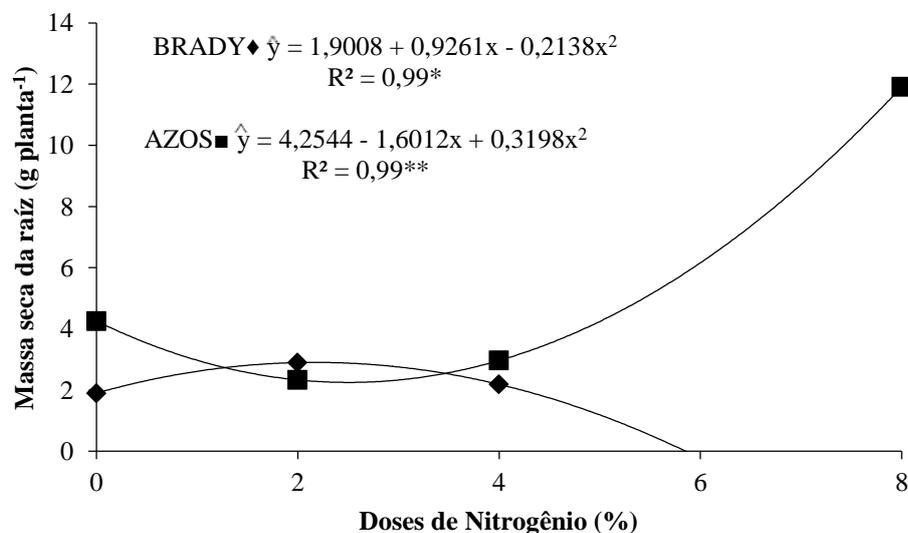


Figura 4. Massa seca da raiz de plantas de soja em função da inoculação com *B. japonicum*, *A. brasilense* e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

Estes efeitos podem ser devido a diversos mecanismos, entre eles, antecipação na FBN nos nódulos, incremento na massa seca dos nódulos, promoção na ocorrência de nodulação heteróloga através do aumento da formação de pêlos radiculares e raízes secundárias, aumento nos sítios de infecção, inibição de fitopatógenos e produção de fitormônios e, influências na partição de matéria seca entre as raízes e parte aérea (Hungria, 2011).

As bactérias *A. brasilense* produzem fitormônios e assim como *Bradyrhizobium sp.* possuem capacidade de fixação de nitrogênio, estas características promovem aumento do volume radicular e dessa forma as bactérias podem atuar em conjunto no crescimento da cultura quando submetidas à co-inoculação (Gitti, 2015).

Resultados semelhantes foram encontrados por Bárbaro (2009), em vários ensaios com *A. brasilense*, onde, verificou-se incrementos no rendimento de fabáceas com a inoculação mista (co-inoculação), obtendo-se valores superiores aos obtidos com somente a inoculação com *Bradyrhizobium*.

Ferlini (2006) e Costa (2014) salientam que o *A. brasilense* tem capacidade de produzir fitormônios que geram maior crescimento do sistema radicular, acrescentando a possibilidade de explorar volume mais amplo de solo e buscando nutrientes em maiores profundidades.

Para a massa seca da parte aérea (Figura 5), verificou-se aumento da mesma de acordo com o aumento das doses de N utilizadas para os tratamentos sem inoculação ($p < 0,05$) e inoculação com *A. brasilense* ($p < 0,01$). No entanto, os dados referente ao tratamento utilizando a bactéria *A. brasilense* sobressaiu-se mais que o tratamento sem a inoculação, obtendo assim maiores valores de massa seca da parte aérea nas doses de 0 % (34,37 g), 4 % (21,9 g) e 8 % de N (95,5 g), tendo uma leve diminuição na dose de 2 % de N. Isso significa que a adubação nitrogenada pode ter influenciado na redução desse caractere, se mostrando menos eficaz quando comparado aos demais resultados desse tratamento.

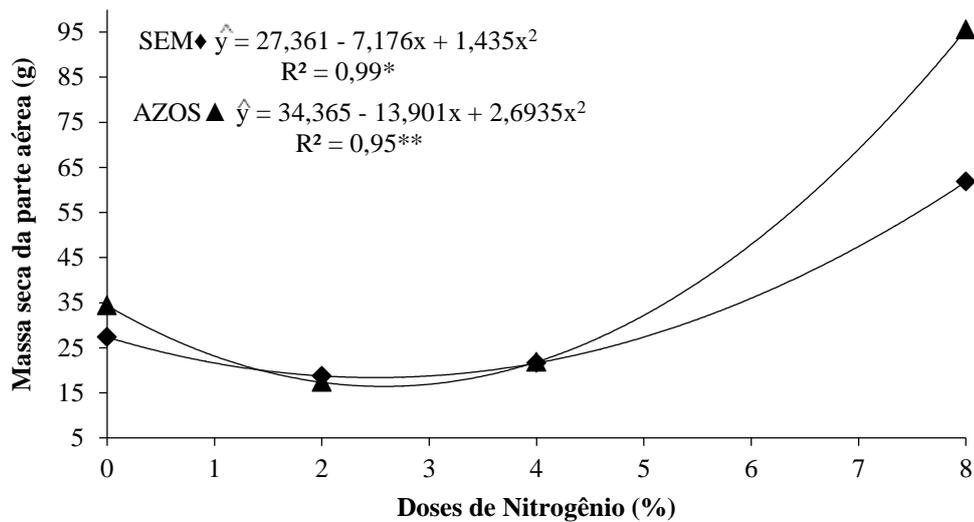


Figura 5. Massa seca da parte aérea de plantas de soja (R_1) em função da ausência de inoculação, inoculação com *A. brasilense* e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

De acordo com Soares et al. (2015) e Felisberto et al. (2015), estas variações estão relacionadas às diferenças no potencial genético, hábito de crescimento, e outros atributos de cada cultivar.

Sabe-se que o N é componente responsável por várias reações nas plantas. Além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas, as clorofilas atuam na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) (Blankenship, 2009), sendo assim, as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas, desde o crescimento à adaptabilidade aos diferentes ambientes. Portanto, os maiores números e massa de nódulos promoveram uma maior fixação de N e, conseqüentemente, uma maior quantidade de clorofila. Tais condições proporcionaram um aumento na taxa fotossintética na planta, na qual proporcionam ganhos na produção de fotoassimilados e, conseqüentemente, melhor acúmulo de matéria seca da parte aérea e das raízes (Zuffo et al., 2019).

Maiores valores de massa seca da parte aérea podem ser referidos, principalmente, a capacidade da planta de soja em explorar maior volume de solo e absorver água e nutrientes em quantidades adequadas para seu desenvolvimento, bem como apresentar maior taxa fotossintética, e como consequência, poderá acumular quantidade maiores de fotoassimilados na parte aérea das plantas, os quais serão redistribuídos de órgãos de residência como folhas, caules e vagens para os grãos.

Para Jordão et al. (2015), embora tenha ocorrido efeito positivo da adubação nitrogenada de 100 kg ha^{-1} nas plantas dos sistemas de produção no outono/inverno, nota-se que não houve aproveitamento do fertilizante nitrogenado para aumentar a produção de massa seca da parte aérea. Em muitos casos, o N aplicado no outono/inverno é absorvido pelas plantas e que, após o início da decomposição da palhada dessas plantas, há início de uma forte competição entre os microorganismos do solo e as plantas de soja pelo N mineralizado da palhada. Este processo de mineralização do N é influenciado por inúmeros fatores, como por exemplo, o teor de N-total do solo, que comumente, quanto menor é este teor, maior será a taxa de imobilização do N pelos microorganismos do solo.

Diferente dos resultados encontrados no estudo de Bárbaro et al. (2009), onde verificaram que a massa seca da parte aérea não diferiu entre os tratamentos com adubação nitrogenada, inoculação, co-inoculação e o controle (sem inoculação e adubação nitrogenada). Outro estudo realizado por Molla et al. (2011), mostraram que a massa seca da parte aérea das plantas de soja não diferenciou-se entre os diferentes tratamentos de inoculação e co-inoculação. No trabalho realizado por Galal (1997), as médias do tratamento de inoculação com *B. diazoefficiens* e N mineral e do tratamento de co-inoculação com *B. diazoefficiens*, *A. brasilense* e N mineral não foram estatisticamente diferentes.

Na figura 6, é verificada interação significativa para a eficiência de nodulação ($p < 0,01$), onde observou-se que no tratamento de co-inoculação, este caractere aumentou conforme o aumento linear da dose de N aplicada, ou seja, a associação das bactérias inoculadas, contribuiu de forma eficaz no aumento da eficiência de nodulação nas plantas.

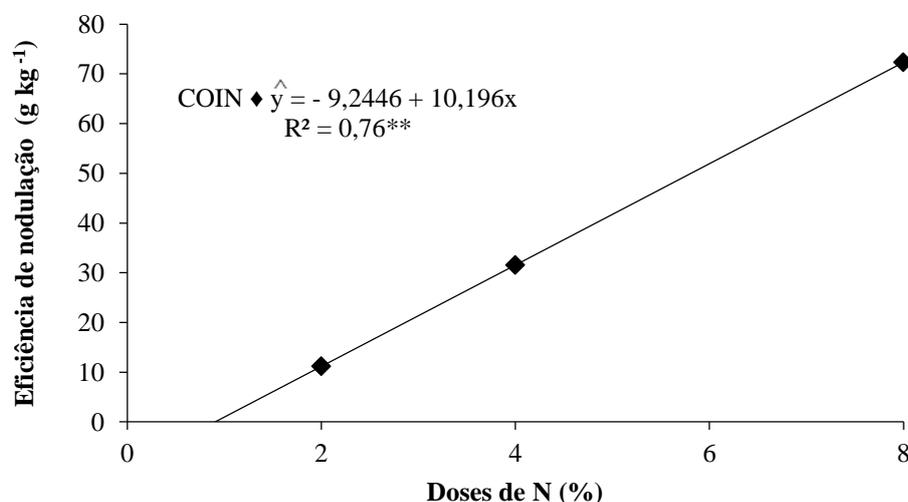


Figura 6. Eficiência de nodulação de plantas de soja em função da co-inoculação e doses de nitrogênio na base, na safra 2018/19 em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de Marechal Cândido Rondon, PR.

A solubilização de fosfato é um dos principais processos que promove benefícios para a FBN, uma vez que o fosfato é um dos constituintes de ATP, e o ATP por sua vez é caracterizado como a energia necessária para o processo de FBN (Marra, 2009). Para cada molécula de N₂ fixada, são necessários 16 ATPs, o que representa um custo energético elevado (Moreira e Siqueira, 2006). Assim, o maior aporte de P pelas bactérias solubilizadoras pode contribuir para maior fixação de N e, conseqüentemente, maior nodulação.

Além disso, o conjunto de diferentes bactérias tem um efeito sinérgico com resposta positiva entre bactérias simbióticas (*B. diazoefficiens*) e diazotróficas (*Bacillus subtilis* e *A. brasilense*), resultando na potencialização da nodulação e maior crescimento radicular que é realizada por bactérias simbióticas. Além disso, bactérias diazotróficas induzem a produção de genes para que ocorra a nodulação (Bárbaro, et al., 2009). Com isso, pode-se afirmar que a co-inoculação apresenta ótimo desempenho quando comparado ao tratamento de inoculação padrão com a utilização de uma bactéria isolada.

Não foram constatadas diferenças significativas para os caracteres altura de plantas, número de vagem por planta, número de grãos por vagem, acúmulo de N na planta e produtividade no uso da inoculação com as bactérias e aplicação de diferentes doses de N nas condições estudadas, sendo que a produtividade média foi de 3.871 kg ha⁻¹.

4.4 CONCLUSÕES

Não foram constatadas diferenças significativas para os caracteres altura de plantas, número de vagem por planta, número de grãos por vagem, acúmulo de nitrogênio na planta e produtividade de grãos nas condições estudadas.

O número de nódulos se mostrou maior na dose de 2 % com médias de 46 nódulos por planta quando inoculada com *B. japonicum*, e nas variáveis de massas seca de nódulos, raiz e parte aérea quando inoculado com *A. brasilense* na dose de 8% obtiveram maiores médias com 486,94 mg planta⁻¹, 11,91 g planta⁻¹, 95,5 g planta⁻¹, respectivamente. A eficiência de nodulação teve aumento linear quando utilizada a dose de 8 % de N com valor de 72,32 g kg⁻¹. Para os caracteres número de nódulos e eficiência de nodulação, houve aumento significativo destes quando utilizada a dose de 2 % de N, associado a pratica de adubação

nitrogenada. Utilizando as doses de 8 %, a massa seca de nódulos, raíz, parte aérea e eficiência de nodulação, obteve resultados mais satisfatórios que as demais doses.

4.5 REFERÊNCIAS

- Almeida JVA. Polêmica do uso de nitrogênio em soja. *Laborsolo academy*: 3. ed; 2015 [citado 2019 Out 18]. Disponível em: <http://www.doutoresdaterra.com.br/plantas/a-polemica-do-uso-de-nitrogenio-em-soja>
- Aratani RG, Lazarini E, Maques RR, Backes C. Adubação nitrogenada em soja na implantação so sistema de plantio direto. *Biosci J*. 2008; 24:31-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89552008000100003>
<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6755/4457>
- Araújo ASF, Carvalho EMS. Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas. Teresina: UFPI, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>
- Araújo FF, Hungria M. Nodulação e rendimento da soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. Brasília: Pesq Agrop Brasi; 1999; [citado 2019 Out 18]. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/16490/1/PAB97284.pdf>.
- Atieno M, Herrmann L, Okalebo R, Lesueur D. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of coinoculation of *Bacillus subtilis* with two diferente strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J Micro Biot*. 2010; 28: 2541-2550. Doi: 10.1007/s11274-012-1062-x. Epub 2012 May 8
- Bárbaro IM, Machado PC, Bárbaro Junior LS, Ticelli M, Miguel FB, Silva JAA. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e coinoculação. *Rev Colloq Agr*. 2009; 5: 01-07. Disponível em: <http://revistas.unoeste.br/index.php/ca/article/view/372/510>
- Barranqueiro HR, Dalchiavon FC. Aplicação de azoto na cultura da soja. *Rev Cienc Agr*. 2017; 40: 196-204. Doi: 10.19084/RCA16030
- Blankenship RE. Fotossíntese: As Reações Luminosas. In: Taiz, L; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
- Bremner JM, Breitenbeck GA. A simple steam distillation method for determination of ammonium in semimicro-Kjeldahl analysis of soil and plant materials using a block digester. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 14:905- 914, 1983.

Campos RJ, Lantmann AF. Efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. *Pesq Agrop Bras.* 1998; 33: 1245-1253. Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4956/7093>. Pdf

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília. Conab; 2019

Conab. Acompanhamento de safra brasileira de grãos. Safra 2019/2020. v. 7. n. 4. Quarto levantamento/Janeiro 2020. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. p. 1-104

Costa EM, Carvalho F, Esteves JA, Nóbrega RSA, Moreira FMS. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. *Enc Bio.* 2014; 10: 1678-1689. Acesso: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014b/AGRARIAS/resposta%20da%20soja%20a%20inoculacao.pdf>

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistema brasileiro de classificação de solos. Embrapa - SPI/Embrapa – Solos. Brasília/Rio de Janeiro, BR. 2013.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de produção de soja: Região Central do Brasil. 3 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

Felisberto G, Bruzi AT, Zuffo AM, Zambiazzi EV, Soares IO, Rezende PM, Botelho FBS. Agronomic performance of RR soybean cultivars using different pre-sowing desiccation periods and distinct post-emergence herbicides. *Afr Jour of Agr Rese.* 2015; 10: 3445-3452. Doi: 10.5897/AJAR2015.9853

Ferlini HA. Co-Inoculación en Soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. *Articulos Técnicos – Agricultura.* 2006. Accessed in: http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycyne_s_articulos_800_AGR.htm. Acesso: 4 fev. 2019

Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis. *Ciênc Agrotec.* 2011; 35: 1039-1042.

Galal YGM. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.). *Biol Fertil Soils.* 1997; 24: 317-322. <https://doi.org/10.1007/s003740050250>

Gitti DC. Inoculação e Coinoculação na cultura da soja. Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015. Maracaju, MS: Fundação MS; 2015.

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja; 2001 [citado 2019 Out 20]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>.

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC; Graham PH. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: Singh RP, Shankar N, Jaiwal PK. (Ed.). Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity. Houston: Studium. 2006b, 43-93.

Hungria M, Campo RJ. Como a soja pode produzir mais. Rev. Cult Grand cult; 2000 [cited 2020 Jan 18]. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/artigos/como-a-soja-pode-produzir-mais>

Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. Co-inoculation of soybeans and common beans with *rhizobia* and *azospirilla*: strategies to improve sustainability. Biol Fertil Soils. 2013; 49: 791-801. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

Hungria M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. 21 ed. Londrina: EMBRAPA SOJA; 2011.

Jordão LT, Melo CVCB, Versari PHV, Coneglian CF, Rodriguero TS, Chaves, DP, Firmano RF, Barzan RR, Muniz AS, Oliveira Junior A, Crusciol CAC. Desenvolvimento da parte aérea de soja em função do manejo com plantas de cobertura e nitrogênio no outono/inverno. In: Anais do Congresso Brasileiro de Soja; Londrina: Embrapa Soja; 2015.

Kaschuk G, Nogueira MA, De Luca MJ, Hungria M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. Fiel Crop Rese. 2016; 195: 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.05.010>

Kws. Parcerias que semeiam o crescimento. Patos de Minas: KWS; 2009 [citado 2019 Out 14]. Disponível em: <https://www.kws.com/br/pt/produtos/soja/portfolio-completo-soja/rk6316-ipro/>

Marra LM. Fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos por bactérias isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] [Dissertação]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2009.

Melo RSde, Zilli JE. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o estado de Roraima. *Pesq Agropec Bras*. 2009; 44: 1177-1183. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900016>

Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M, Puteh, AB. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean coinoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Bio & Bio*. 2011; 33: 457-463. Doi: 10.1016/S0038-0717(00)00186-3

Moreira FMS, Siqueira JO. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 ed. Lavras: editora UFLA; 2006.

Moreno G, Albrecht AJP, Pierozan Junior C, Pivetta AT, Tessele A, Lorenzetti JB, Furtado R CN. Application of nitrogen fertilizer in high-demand stages of soybean and its effects on yield performance. *Aust Jour of Crop Scie*. 2018; 12: 16-21. Doi: 10.21475/ajcs.18.12.01.pne507

Nogueira MA, Prando AM, Oliveira AB, Lima D, Conte O, Harger N, Oliveira FT, Hungria M. Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

Prando AM, Oliveira AB, Lima D, Possamai EJ, Reis EA, Nogueira MA, Hungria M, Harger M, Conte O. *Coinoculação da soja com Bradyrhizobium e Azospirillum na safra 2018/2019 no Paraná*. Londrina: Embrapa Soja, 2019.

Rolas. *Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. 10. ed. Porto Alegre, 2004.

Sediyama T. *Produtividade da soja*. Londrina: Mecenaz; 2016.

Soares IO, Rezende PM, Bruzi AT, Zuffo AM, Zambiazzi EV, Fronza V, Teixeira CM. Interaction between soybean cultivars and seed density. *Americ Jour of Plant Scien.* 2015; 6: 1425-1434. Doi: 10.4236/ajps.2015.69142

Zuffo AM, Steiner F, Busch A, Santos DMS. Adubação nitrogenada na soja inibe a nodulação e não melhora o crescimento inicial das plantas. *Rev em Agron e Meio Amb.* 2019; 12: 333-349. Doi: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n2p333-349>

5 CONCLUSÕES GERAIS

Para o experimento em casa de vegetação, não houve interação significativa entre as inoculação e doses de N para massa seca dos nódulos, altura de plantas, número de vagem por planta e produtividade de grãos nas condições estudadas.

A utilização das doses crescentes e acima de 2 % de N na semeadura da soja promoveu redução no número de nódulos formados por *B. japonicum* nas raízes da soja. O número de nódulos e massa seca de raiz da soja se mostrou maior na dose de 8 % de N, com uma média de 317 nódulos por planta e 23,42 g planta⁻¹, porém quando inoculadas com o *A. brasilense*. A eficiência de nodulação teve aumento positivo quando utilizada a dose de 2 % de N com valor de 354 g kg⁻¹.

O acúmulo de N na parte aérea apresentou melhor valor na dose de 8 % de N e alcançando 142 g kg¹ quando realizou-se a co-inoculação, indicando capacidade de respostas diferentes para os caracteres massa seca de raiz e número de grãos por vagem. A prática de adubação nitrogenada resultou no aumento do número de nódulos apenas da bactéria *A. brasilense* e ganhos significativos de N na planta somente na dose de 8 % de N.

Para o experimento de campo, não foram constatadas diferenças significativas para os caracteres altura de plantas, número de vagem por planta, número de grãos por vagem, acúmulo de nitrogênio na planta e produtividade de grãos nas condições estudadas.

O número de nódulos se mostrou maior na dose de 2 % com médias de 46 nódulos por planta quando inoculada com *B. japonicum*, e nas variáveis de massas seca de nódulos, raiz e parte aérea quando inoculado com *A. brasilense* na dose de 8% obtiveram maiores médias com 486,94 mg planta⁻¹, 11,91 g planta⁻¹, 95,5 g planta⁻¹, respectivamente. A eficiência de nodulação teve aumento linear quando utilizada a dose de 8 % de N com valor de 72,32 g kg⁻¹. Para os caracteres número de nódulos e eficiência de nodulação, houve aumento significativo destes quando utilizada a dose de 2 % de N, associado a prática de adubação nitrogenada. Utilizando as doses de 8 %, a massa seca de nódulos, raiz, parte aérea e eficiência de nodulação, obteve resultados mais satisfatórios que as demais doses.