

CO-INOCULAÇÃO E MODOS DE APLICAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA NODULAÇÃO DAS PLANTAS E RENDIMENTO DA CULTURA DA SOJA

Alessandro Lucca Braccini^{1*}; Giovanna Emanuelle Gonçalves Mariucci²; Andréia Kazumi Suzukawa²; Luiz Henrique da Silva Lima³; Gleberon Guillen Piccinin⁴

SAP 10565 Data envio: 16/08/2014 Data do aceite: 10/12/2014

Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, jan./mar., p. 27-35, 2016

RESUMO - À medida que as técnicas de cultivo evoluem, as culturas requerem o desenvolvimento de novas tecnologias e práticas de manejo que almejem maiores rendimentos com menor custo de produção. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da co-inoculação e de diferentes modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação e produtividade da cultura da soja. O experimento foi implantado no mês de novembro de 2013 em área localizada na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de uma testemunha, adubação com nitrogênio (200 kg de N ha⁻¹), inoculação padrão nas sementes (inoculante líquido e turfoso), co-inoculação na semente e co-inoculação no sulco de semeadura, utilizando diferentes doses de inoculante a base de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*. As seguintes determinações foram efetuadas em campo e em laboratório: número de nódulos no início do florescimento, massa de nódulos no início do florescimento, massa seca da parte aérea, teor de nitrogênio na parte aérea, teor de nitrogênio nos grãos, número de vagens/planta, massa de mil grãos e produtividade. Os resultados obtidos permitem concluir que a inoculação via sementes com inoculante líquido apresenta a opção adequada para o produtor rural, nas condições do experimento. A adubação nitrogenada não apresentou incrementos de rendimento e componentes de produtividade, sendo desnecessária.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merrill, sementes, inoculação, produtividade.

SOYBEAN CO-INOCULATION WITH *Bradyrhizobium japonicum* AND *Azospirillum brasilense* AND NITROGEN FERTILIZATION ON PLANT NODULATION AND CROP YIELD

ABSTRACT - As new cultivation techniques arise, crops require the development of new technologies and management practices that aim higher yields with lower production cost. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency of co-inoculation and different ways of application of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization on nodulation and yield of soybean. The experiment was established in November 2013 in an area located in the Iguatemi Experimental Farm, of State University of Maringá (UEM). The design was a randomized block with four replications. The treatments consisted of a control, fertilization with nitrogen (200 kg N ha⁻¹), standard inoculation in seeds (liquid and peat inoculant), co-inoculation on seed and co-inoculation at sowing, using different doses of inoculant *B. japonicum* and *A. brasilense*. The following determinations were carried out in the field and in the laboratory: number of nodes at flowering, mass of nodules at flowering, the shoot dry mass, nitrogen content in the shoot, grain nitrogen content, number of pods/plant, thousand grain mass and yield. The results showed that inoculation through seed treatment with liquid inoculant presents an adequate option to farmers, in the conditions of this experiment. Nitrogen fertilization did not increase yield and yield components, being unnecessary.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill, seeds, inoculation, productivity.

INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura que demanda grandes quantidades de nitrogênio (N), sendo necessários 80 kg de N para produzir 1.000 kg de grãos (HUNGRIA et al., 2001).

A inoculação das sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, fornece praticamente todo o nitrogênio que a planta necessita (TAIZ; ZEIGER, 2004). Também, é crescente a preocupação com a poluição dos recursos hídricos e da atmosfera, pelo uso de fertilizantes

¹Dr., Engenheiro Agrônomo, Professor do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, UEM, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: albraccine@uol.com.br. * Autor para correspondência

²Engenheira Agrônoma, Mestranda em Agronomia na UEM. E-mails: mariuccigi@gmail.com e kazumi.s@gmail.com

³Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Genética e Melhoramento na UEM. E-mail: lhds18@hotmail.com

⁴MSc., Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Agronomia na UEM. E-mail: guillen.piccinin@hotmail.com

nitrogenados (PANG et al., 1997; LARA CABEZAS et al., 2000), além do elevado custo energético para a obtenção dos mesmos.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) promovida por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tem substituído a adubação nitrogenada mineral, possibilitando elevadas produtividades de grãos na soja (HUNGRIA et al., 2005). Entretanto, a eficiência desse processo é influenciada por fatores edafoclimáticos e práticas de manejo, como o tratamento químico de sementes antes da inoculação (CAMPO et al., 2009; ZILLI et al., 2009).

Uma prática alternativa para a inoculação das sementes é a aplicação das bactérias pulverizadas diretamente no sulco de semeadura, na mesma operação de distribuição da semente (ZHANG; SMITH, 1996). A aplicação no sulco pode ser indicada para condições adversas, como solos secos e quentes ou para sementes tratadas com produtos deletérios à bactéria, como alguns fungicidas e inseticidas (RAMOS; RIBEIRO, 1993). Entretanto, ainda são poucas as informações sobre os benefícios advindos do uso dessa prática.

Alguns trabalhos avaliaram a inoculação no sulco de semeadura, com resultados que encorajam o emprego dessa técnica em ervilha (BEGUM et al., 2001), feijão (RAMOS; RIBEIRO, 1993) e soja (FARIAS NETO et al., 2006). Por sua vez, Greenfield (1991) verificou que a produção de sementes e a nodulação não foram incrementadas com a aplicação no sulco de semeadura na soja.

Independentemente da forma de aplicação do inoculante, é notório que os ganhos em produtividade decorrentes da reinoculação são menos expressivos do que aqueles obtidos em solos de primeiro ano de inoculação com a bactéria (CAMPOS, 1999; CAMPOS; GNATTA, 2006). Entretanto, há relatos de resposta à reinoculação, resultando em incrementos no rendimento de grãos de soja, com ganhos médios de 4,5% (EMBRAPA, 2004) mesmo em solos com número elevado de células de *Bradyrhizobium* spp., em experimentos realizados nos Cerrados (VARGAS; HUNGRIA, 1997) e no Estado do Paraná (HUNGRIA et al., 1997).

Em relação à quantidade de inoculante utilizados, em áreas novas, sem histórico de inoculação ou em áreas de elevada acidez, é recomendado a aplicação do dobro da dose, pois a sobrevivência da bactéria é afetada pela acidez do solo e pela competição entre estirpes nativas e introduzidas (CHUEIRI et al., 2005). Com o aumento da dose, espera-se que a prática possa recompensar a perda de células viáveis em solos de baixo pH (SILVA et al., 2011). Krasova-Wade et al. (2006) observaram que ao elevar a densidade rizobiana na inoculação, houve aumento da competitividade das estirpes inoculadas contra a população rizobiana nativa. Entretanto, Campos (1999) não encontrou benefícios de doses de inoculantes em áreas de plantio direto estabelecido.

Outro grupo de microrganismos benéficos são bactérias associativas capazes de promover o crescimento das plantas através da produção de hormônios de crescimento, indução de resistência a doenças e estresses ambientais, a capacidade de solubilizar fosfato e, também,

de realizar a FBN. Dentre essas bactérias, destacam-se as pertencentes ao gênero *Azospirillum*, utilizadas mundialmente como inoculantes em gramíneas.

Considerando as principais limitações atuais e potenciais da FBN com a soja e os benefícios atribuídos a diversas culturas pela inoculação com *Azospirillum brasilense*, deduz-se que a co-inoculação com ambos os organismos pode melhorar o desempenho das culturas, em uma abordagem que respeita as demandas atuais de sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental. Contudo, embora existam em outros países estudos que reportem os benefícios da co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum*, torna-se necessário conduzir ensaios nas condições brasileiras (HUNGRIA et al., 2013).

Nesse sentido, trabalhos desenvolvidos com a finalidade de comparar o processo de co-inoculação da cultura da soja com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* no sulco de semeadura com a inoculação tradicional nas sementes, bem como a prática de fertilização mineral do solo, são necessários. Portanto, é necessária a realização de experimentos que contribuam na formação de um posicionamento sólido quanto à questão da aplicação do inoculante líquido (*Bradyrhizobium* spp.) via sulco de semeadura, associado ou não ao uso do inoculante para gramíneas (*Azospirillum brasilense*), em comparação com a aplicação convencional via tratamento de sementes.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da co-inoculação e de diferentes modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e seu efeito na nodulação, nos teores de N e nos componentes de produtividade da cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de campo foi instalado no ano agrícola de 2013/2014, em área localizada na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, região noroeste do Estado do Paraná (23° 25' S e 51° 57' W, 540 m). O clima é do tipo Cfa, mesotérmico úmido, segundo classificação de Köppen (CAVIGLIONE et al., 2000). Dados de precipitação pluvial, temperatura máxima e mínima diária e umidade relativa do ar, referentes ao período de duração do experimento em campo, estão apresentados na Figura 1. O solo da área experimental é classificado como Argissolo Vermelho distroférrico (EMBRAPA, 1999) de textura média.

As avaliações físico-química das sementes e de rendimento e massa de mil grãos foram conduzidas nos Laboratórios de Tecnologia de Sementes, do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (NUPAGRI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da UEM.

Anteriormente à instalação do experimento, foi realizada a análise química e física do solo (Tabela 1). A instalação e condução da lavoura experimental foram realizadas de acordo com os pressupostos da Embrapa Soja (2011). Na adubação foi utilizado 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100 kg ha⁻¹ de K₂O em solo preparado convencionalmente 15 dias antes da implantação da cultura. Na Tabela 2 são

apresentados os resultados do número mais provável de bactérias presentes no solo da área experimental, antes da implantação do ensaio de campo.

A cultivar utilizada para a semeadura foi a BMX Potência RR, tratadas industrialmente com o fungicida fludioxonil (Maxim Advanced®) e o inseticida thiametoxan (Cruiser 350FS®), nas doses de 50 mL 50 kg⁻¹ e 100 mL 50 kg⁻¹, respectivamente, além das respectivas dosagens de inoculante para cada tratamento.

Logo após o tratamento das sementes, foi realizada a semeadura, manualmente, em sulcos com espaçamento de 0,45 m entre linhas, na profundidade de 3 cm e densidade de semeadura de 15 sementes por metro linear. As parcelas foram constituídas de oito linhas de 5 m de comprimento. Para as avaliações, foi utilizada uma área útil de 10,8 m².

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com 11 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de uma testemunha, adubação com nitrogênio no solo (200 kg de N ha⁻¹), inoculação padrão nas sementes (inoculante líquido e

turfoso), co-inoculação na semente e co-inoculação no sulco de semeadura, utilizando diferentes doses, com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* (Tabela 3). O produto comercial utilizado como fonte de *Bradyrhizobium japonicum* foi o inoculante Masterfix®, estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5079 (5x10⁹ de células viáveis por g ou mL), e como fonte de *Azospirillum brasilense* foi o Masterfix Gramíneas®, estirpes Abv5 e Abv6 (2x10⁸ células viáveis por mL). A inoculação foi realizada à sombra, no máximo duas horas antes da semeadura e as sementes inoculadas encontraram-se protegidas do sol e do calor excessivo.

Para as aplicações dirigidas no sulco de semeadura foi utilizado pulverizador costal propelido a CO₂, com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), uma vazão de 0,35 L min⁻¹, equipado com lança contendo 1 bico leque da série Teejet tipo XR 110 02, que, trabalhando a uma altura de 50 cm do alvo e a uma velocidade de 1 m segundo⁻¹, atingindo uma faixa aplicada de 50 cm de largura, propiciou um volume de calda de 100 L ha⁻¹.

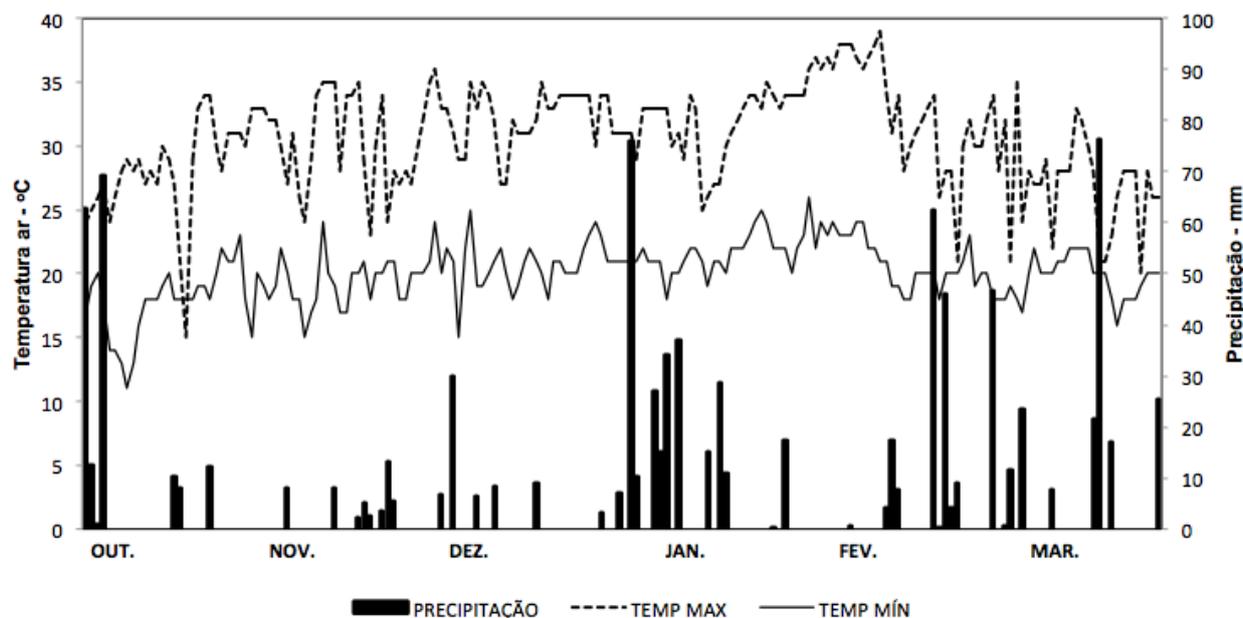


FIGURA 1 - Dados climáticos diários da precipitação pluvial, temperatura máxima e mínima, de outubro a março na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), na safra 2013/2014.

TABELA 1. Resultado da análise química e física do solo da área experimental, antes da implantação da cultura (Maringá, PR, UEM – 2012/2013).

Profundidade (cm)	¹ P	² pH		H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	¹ K	³ Ca	³ Mg	SB	CTC	V	⁴ C
	mg dm ⁻³	CaCl ₂	H ₂ O	cmol _c dm ⁻³			-----			%	g dm ⁻³	
0 – 20	5,05	5,93	6,67	4,17	0,00	0,39	4,06	1,48	5,93	10,1	58,7	9,35
	⁵ S-SO ₄ ²⁻	Zn	Fe	Cu	Mn	Areia grossa	Areia fina	Argila	Silte			
	-----mg dm ⁻³ -----			-----			-----%					
	8,26	4,03	135,00	17,58	154,70	49	15	30	6			

¹Extrator Mehlich 1; ²CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; ³KCl 1 mol L⁻¹; ⁴Método Walkley-Black; ⁵Método Fosfato Monocálcico.

TABELA 2. Número mais provável (NMP) de *Bradyrhizobium* spp. e bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental.

Produto/Lote	Número de células de bactérias g ⁻¹
Código Interno 071/13	7,23 10 ² bactérias g ⁻¹ (Metodologia 1)
Código Interno 071/13	9,5 10 ⁵ bactérias g ⁻¹ (Metodologia 2)

Metodologia 1: consiste em inoculação de diluições seriadas das amostras, em plantas testes específicas, cultivadas em condições assépticas, avaliando a formação de nódulos;

Metodologia 2: consiste em inoculação de diluições seriadas das amostras, em meio semi-sólido NFB, avaliando a presença de película nos frascos do teste; características dos organismos diazotróficos associativos;

Fonte: Certificado de Análise: contagem de células pelo número mais provável, Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Outubro de 2013.

TABELA 3. Tratamentos com aplicação dos inoculantes Masterfix[®] (*Bradyrhizobium japonicum*) e Masterfix Gramíneas[®] (*Azospirillum brasilense*) nas sementes de soja, em diferentes formulações (turfa e líquida), doses e modos de aplicação (Maringá, PR, UEM – 2013/2014).

Número	Tratamentos
1	Testemunha
2	200 kg ha ⁻¹ de N
3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Turfosso - 1 dose)* – SEMENTE
4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 1 dose)* – SEMENTE
5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 1 dose) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 1 dose) – SEMENTE
6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 1 dose) – SEMENTE + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 2 doses) – SULCO
7	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 3 doses) – SULCO
8	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 3 doses) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 1 dose) – SULCO
9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 3 doses) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 2 doses) – SULCO
10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 3 doses) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 3 doses) – SULCO
11	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Masterfix [®] Líquido - 3 doses) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Masterfix Gramíneas [®] - 4 doses) – SULCO

*Masterfix[®] (turfa ou líquido), 1 dose = 100 g ou 100 mL por saca de 50 kg. Masterfix Gramíneas[®], 1 dose = 100 mL ha⁻¹.

A avaliação da nodulação foi realizada no estádio R₁, coletando-se dez plantas por parcela, com raízes intactas. A coleta foi realizada mantendo o volume de solo pré-estabelecido com 20 cm de profundidade e 40 cm de largura, com auxílio da pá-de-corte. Os nódulos foram lavados, destacados, secados em estufa a 65 °C, até obter peso constante e determinada a massa de nódulos.

A massa seca da parte aérea foi determinada concomitantemente à variável anterior, em dez plantas coletadas. As amostras foram colocadas em sacos papel “Kraft” e secadas em estufa a 65 °C, até atingir peso constante.

A determinação do teor de nitrogênio na parte aérea e nos grãos foi realizada utilizando-se o método de Kjeldahl, na quantificação de nitrogênio total, conforme

recomendação da Association of Official Analytical Chemists (1990) e Vitti et al. (2001), com modificações.

Para o número de vagens por planta foram feitas contagens em 10 plantas na parcela experimental, no estádio R₇, antes da maturação plena.

Em relação ao rendimento, as plantas foram colhidas manualmente, cinco a oito dias após o estádio de desenvolvimento R₈. Após a colheita das plantas, as vagens foram debulhadas em máquina trilhadora estacionária, limpas com o auxílio de peneiras, secas em condições naturais e acondicionadas em sacos de papel “Kraft”.

A massa de mil grãos foi determinada por meio da pesagem de oito subamostras de 100 grãos, por repetição, multiplicando-se os resultados por 10 (BRASIL, 2009).

Para o cálculo do rendimento e da massa de mil grãos, o grau de umidade foi corrigido para 13% base úmida.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,10$) e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de t - LSD ($p < 0,10$), de acordo com Banzatto e Kronka (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4, encontram-se os resultados médios obtidos nas variáveis número e massa de nódulos na raiz

total (principal e secundárias), teor de N na parte aérea e nos grãos, bem como a massa seca da parte aérea, em resposta aos tratamentos de co-inoculação na cultura da soja com inoculantes à base de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, sendo possível inferir que ocorreram diferenças significativas ($p < 0,10$) para estas variáveis.

TABELA 4. Médias das variáveis massa de nódulos (M.NOD), número de nódulos na raiz total (N.NOD) no estágio R₁, teor de N na parte aérea (T.N.P.A.), teor de N nos grãos (T.N.G.) e massa seca da parte aérea em R₁ (M.S.P.A.), em resposta aos tratamentos de co-inoculação na cultura da soja (Maringá, PR – 2013/14).

Tratamentos	M.NOD	N.NOD	T.N.P.A.	T.N.G.	M.S.P.A.
	(mg pl ⁻¹)*	(unid. pl ⁻¹)*	(%)	(%)	(g)
1	56,11 D	4,43 C	3,55 F	5,60 E	7,14 D
2	91,25 D	7,08 C	5,10 A	6,77 CD	10,66 CD
3	273,08 C	14,90 B	4,77 ABC	6,40 D	16,60 AB
4	504,87 A	18,48 AB	4,92 AB	6,78 CD	19,66 A
5	140,43 CD	16,48 B	4,52 BCD	6,25 D	15,36 B
6	472,53 A	15,06 B	4,60 BCD	7,34 BC	13,98 BC
7	204,15 BC	13,66 B	4,33 CDE	7,51 B	13,23 BC
8	262,53 B	16,73 B	4,00 EF	7,25 BC	14,27 BC
9	400,16 A	22,70 A	4,76 ABC	8,28 A	16,39 AB
10	283,40 B	15,33 B	4,23 DE	7,36 BC	13,11 BC
11	255,78 B	13,70 B	4,16 DE	7,21 BC	11,26 C
Média	267,94	14,42	4,45	6,98	7,79
C.V. (%)	32,70	30,57	8,56	7,08	22,67

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste t - LSD, em nível de 10% de probabilidade;

*unid. pl⁻¹: unidade por planta; mg pl⁻¹: miligramas por planta.

Em todos os tratamentos empregados, seja com inoculação padrões das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* isolado, na formulação turfosa ou líquida (tratamentos 3 e 4), ou, então, associada com diferentes doses e formas de aplicação de *Azospirillum brasilense* (tratamentos 5 a 11), com exceção do tratamento 5 para a variável peso de nódulos, observou-se aumento no número de nódulos e no peso de nódulos (Tabela 4), quando comparado com os tratamentos em que não foi realizada a inoculação (tratamentos 1 e 2).

Em geral, quando se realizou a inoculação com uma dose de *Bradyrhizobium* (100 mL 50 kg⁻¹) via tratamento de sementes (tratamento 4) ou com três doses de *Bradyrhizobium japonicum* (300 mL 50 kg⁻¹), associado com a aplicação de duas doses do *Azospirillum brasilense* (200 mL 50 kg⁻¹), via sulco de semeadura (tratamento 9), ocorreu aumento no peso médio de nódulos no estágio R₁

(Tabela 4), sendo os valores significativamente superiores ($p < 0,10$) ao da testemunha (tratamento 1), bem como da adubação nitrogenada (tratamento 2), utilizando a dose de 200 kg ha⁻¹ de N. Os tratamentos 1 e 2 obtiveram, por conseguinte, os resultados inferiores nessa variável, com valores na ordem de 56,11 e 91,25 gramas de nódulos por planta, respectivamente. Este resultado inferior está relacionado à ausência de inoculação nos respectivos tratamentos, corroborando com os obtidos em vários outros locais do Brasil, indicando que a adubação nitrogenada na cultura da soja é desnecessária, desde que seja realizada a inoculação (MENDES et al., 2000; BÁRBARO et al., 2006). Assim, é possível influenciar positivamente a qualidade dos solos ao evitar os problemas causados pelo uso de adubos nitrogenados (PANG et al., 1997; LARA CABEZAS et al., 2000).

Os resultados obtidos nesse ensaio, quando comparado a outros estudos do mesmo gênero, mostraram-se com nodulação adequada, uma vez que o peso de nódulos variando entre 100 e 200 mg planta⁻¹ seriam suficientes para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; HUNGRIA et al., 2007; BRANDELERO et al., 2009).

Já para o número de nódulos em raiz total (Tabela 4), todos os tratamentos, ou seja, aqueles envolvendo a inoculação isolada com *Bradyrhizobium japonicum* na formulação líquida ou turfosa, via tratamento de sementes, bem como associados à co-inoculação com *Azospirillum brasilense*, quando aplicados diretamente no sulco de semeadura, apresentaram resultados médios superiores, quando comparados com a testemunha absoluta e com a adubação nitrogenada (tratamentos 1 e 2, respectivamente). Desta forma, a aplicação do *Bradyrhizobium japonicum* via tratamento de sementes ou pulverizado no sulco de semeadura, em diferentes doses, associado à *Azospirillum brasilense*, reflete a capacidade das bactérias em promover maior desenvolvimento das plantas de soja, com impacto positivo no rendimento de grãos. Com esta variável verifica-se também que a FBN é capaz de prover o nitrogênio necessário à planta, em comparação com tratamentos com fertilizantes nitrogenados.

Destaca-se, contudo, o tratamento 9 (*Bradyrhizobium*, 3 doses e *Azospirillum brasilense*, 2 doses, aplicados no sulco) por apresentar valores significativamente superiores ($p < 0,10$) a todos os demais tratamentos. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Câmara (2000), que revelou que plantas com 10 a 30 nódulos no florescimento, apresentam condições suficientes para a obtenção de altos teores de nitrogênio fixado e, conseqüentemente, elevado rendimento de grãos. Por isso, é necessário realizar estudos que comprovem as interações biológicas de *Bradyrhizobium* spp. com outras bactérias presentes no solo, como as bactérias diazotróficas, em especial as pertencentes ao gênero *Azospirillum*.

Acredita-se que combinações de bactérias aplicadas possam proporcionar incremento nas características agrônomicas da soja, resultando em uma maior fixação de nitrogênio proporcionada pela atuação desses microorganismos. A utilização de *A. brasilense* tem demonstrado efeitos benéficos na referida associação, pois a bactéria tem capacidade de produzir fitohormônios, que resultam em maior desenvolvimento do sistema radicular e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (FERLINI, 2006). A estimulação da nodulação posterior pela inoculação com *A. brasilense* pode estar relacionada com o incremento na indução da produção de genes Nod, responsáveis pelo incremento de raízes laterais, da densidade de pêlos radiculares e das ramificações dos seus pêlos (BURDMANN et al., 2000).

Em relação ao teor de N na parte aérea (Tabela 4), o tratamento 2, com aplicação de 200 kg ha⁻¹ de N, apresentou o maior valor médio, com 5,1%, porém, não diferindo significativamente ($p > 0,10$) dos tratamentos 3,

4 e 9. Foi observado menor média entre os tratamentos testados novamente no tratamento 1 (testemunha). Esta variável não se relacionou diretamente com a percentagem de N nos grãos, em que o tratamento 9, com a aplicação de 3 doses de *Bradyrhizobium japonicum* conjugada com 2 doses de *Azospirillum brasilense* via sulco de semeadura, proporcionou o maior incremento nessa variável nos grãos de soja. Segundo Carvalho et al. (2011), a possível explicação para a não correlação existente entre esses resultados seria a existência de vários processos complexos envolvidos no uso de nitrogênio, tais como: absorção, assimilação e re-translocação do N na planta de soja.

Em relação à avaliação da massa seca da parte aérea no estágio R₁ (Tabela 4), o tratamento 4 foi aquele que proporcionou o maior acréscimo significativo ($p < 0,10$) nessa variável, quando comparados com a testemunha (tratamento 1). Contudo, não houve diferença entre esse tratamento e os tratamentos 9 e 3. Os demais tratamentos apresentaram resultados intermediários na referida característica. Estes resultados estão de acordo com as demais variáveis avaliadas anteriormente, ou seja: número de nódulos na raiz, assim como no peso de nódulos na raiz, nas quais o incremento na massa seca da parte aérea pode estar relacionado com a eficiência da co-inoculação de *Bradyrhizobium* spp. com *Azospirillum brasilense*, aplicados via sulco de semeadura, com todos os cuidados necessários para não diminuir a viabilidade das bactérias.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados do número de vagens por planta, peso de mil grãos e rendimento, em resposta aos tratamentos de co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,10$), quanto ao número de vagens por planta (Tabela 5). O maior valor absoluto nessa característica foi observado no tratamento 4 (inoculação padrão das sementes com *Bradyrhizobium japonicum*), com 67,2 vagens por planta; contudo, não diferindo significativamente ($p > 0,10$) dos tratamentos 3 e 9.

Em relação ao peso de mil grãos (Tabela 5), os tratamentos 4 e 9 novamente foram aqueles que promoveram os maiores acréscimos significativos quando comparado aos demais. Resultados inferiores foram observados nos tratamentos 1 e 2. Desta forma, é possível inferir que, quando foi efetuada a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* nas sementes ou a co-inoculação com *Azospirillum brasilense*, no sulco de semeadura, o peso de mil grãos foi superior ao tratamento controle (testemunha) e ao tratamento com fertilizante nitrogenado. Estes tratamentos foram superiores também à inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* na forma turfa e para as demais combinações de formas de aplicação dos inoculantes e doses. Os benefícios, tanto da inoculação, como da co-inoculação, em áreas de cultivo com a cultura da soja foram expressivos, desde que observadas às indicações técnicas abordadas no presente trabalho.

Na avaliação do rendimento de grãos (Tabela 5), observa-se que os tratamentos 4, 6 e 9 foram aqueles que

promoveram desempenhos superiores produtivos na cultura da soja, ou seja, apresentaram resultados significativamente superiores ($p < 0,10$) à testemunha (tratamento 1), bem como aos demais tratamentos. Desta forma, em geral, é possível inferir com segurança que a aplicação de 100 mL $saca^{-1}$ de *Bradyrhizobium japonicum* via tratamento de sementes (tratamento 4) ou a aplicação de 300 mL $saca^{-1}$ (3 doses) do referido rizóbio, em

associação com *Azospirillum brasilense* na dose de 200 mL ha^{-1} , em pulverização dirigida no sulco de semeadura (tratamento 9), pode potencializar a fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja, promovendo maior crescimento do sistema radicular, com consequente aumento no rendimento de grãos.

TABELA 5. Resultados médios do número de vagens por planta (N.VAG), massa de mil grãos (M.M.G.) e rendimento (REND.), em resposta aos tratamentos de co-inoculação na cultura da soja (Maringá, PR – 2013/14).

Tratamentos	N.VAG	M.M.G.	REND.
	(unid. pl^{-1})	(g)	(kg ha^{-1})
1	35,10 G	87,82 F	1.928,13 C
2	40,05 FG	90,20 F	2.120,94 C
3	60,10 AB	106,81 BC	2.502,95 B
4	67,20 A	116,54 A	3.300,36 A
5	54,07 BCD	100,31 DE	2.653,97 B
6	45,13 EF	109,25 B	3.147,33 A
7	46,46 DEF	103,40 CD	2.730,44 B
8	47,40 DEF	101,21 DE	2.548,29 B
9	59,40 ABC	115,58 A	3.346,90 A
10	51,07 CDE	102,10 DE	2.721,41 B
11	46,87 DEF	98,57 E	2.652,25 B
Média	50,26	102,89	2.695,72
C.V. (%)	14,40	3,73	7,49

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste t - LSD, em nível de 10% de probabilidade.

A co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense* via sulco de semeadura pode garantir uma maior população de bactérias no momento da germinação, proporcionando o maior número de células, o que permite a formação de nodulação abundante e eficiente junto à coroa da planta, favorecendo a fixação biológica de nitrogênio mais rapidamente. Consequentemente, propicia maiores rendimentos na soja. Assim, a interação biológica entre bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* substituem eficientemente a utilização da adubação mineral nitrogenada na cultura da soja.

Entretanto cabe ressaltar que a inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* através do tratamento de sementes (tratamento 4) apresentou resultados superiores entre os demais tratamentos avaliados ou sem diferenças significativas com tratamentos de co-inoculação, para a maioria das variáveis analisadas. Sendo, portanto a opção mais adequada para o produtor rural, de menor custo.

Apesar da inoculação ser uma prática adotada frequentemente pelos produtores rurais, podem ocorrer casos de falha na nodulação das plantas na lavoura,

especialmente em áreas de primeiro cultivo de soja, o que na maioria das vezes compromete o rendimento de grãos. Por isso, torna-se necessário utilizar inoculantes dentro do prazo de validade, com garantia de número mínimo de células viáveis, realizar a semeadura com boa disponibilidade hídrica para a garantia da germinação das sementes e emergência das plântulas, bem como realizar o tratamento de sementes com fungicidas compatíveis com as bactérias, entre outros procedimentos recomendados pela pesquisa.

CONCLUSÕES

A inoculação via tratamento de sementes e a utilização da associação do *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense*, via sulco de semeadura, proporcionou incrementos nos caracteres fisiológicos, bem como promoveu acréscimos no rendimento de grãos da soja, quando comparado com a testemunha. A introdução de bactérias via sementes, portanto, apresenta-se como uma opção ideal, devido ao menor custo para o produtor rural.

Ressalta-se que a inoculação com bactérias é

Co-inoculação e modos de aplicação...

BRACCINI, A. L. et al. (2016)

suficiente para suprir a necessidade de fonte nitrogenada para a cultura da soja nas condições deste trabalho, sendo a adubação nitrogenada desnecessária se realizado a inoculação.

AGRADECIMENTO

À Embrapa Soja pelo apoio à pesquisa e à condução do experimento. À CNPq, CAPES e Fundação ARAUCÁRIA pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official methods of analysis**. Washington, D.C.: AOAC, 1975. 1054p.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1633-1643, 1999.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2008. 237 p.

BÁRBARO, I. M.; TICELLI, M.; SILVA, G. P.; ARAÚJO, S. C.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A.; BÁRBARO-JUNIOR, L. S. Avaliação de soja (*Glycine max*) cultivar IAC-23 quanto a eficiência na fixação biológica de nitrogênio, em área de reforma de pastagem em Colina-SP. **Revista Unimar Ciências**, v.15, n.1-2, p.63-70, 2006.

BEGUM, A. A.; LEIBOVITCH, S.; MIGNER, P.; ZHANG, F. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. **Plant Soil**, v.237, p.71-80, 2001.

BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, p.581-588, 2009.

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

BURDMANN, S.; HAMAOU, B.; OKON, Y. Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. **The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. Israel: The Hebrew University of Jerusalem**, p. 145-152, 2000.

CÂMARA, G. M. S. Nitrogênio e produtividade da soja. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2000. p.295-339.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p.154-163, 2009.

CAMPOS, B. H. C. Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, v. 29, p.423-426, 1999.

CAMPOS, B. H. C.; GNATTA, V. Inoculantes e fertilizantes foliares na soja em área de populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.69-76, 2006.

CARVALHO, R. P.; VON PINHO, R. G.; DAVIDE, L. M. C. Desempenho de cultivares de milho quanto à eficiência de utilização de nitrogênio. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, p.108-120, 2011.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina : IAPAR, 2000. CD.

CHUEIRI, W. A.; PAJARA, F.; BOZZA, D. Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja. Manah: Divulgação técnica, nº 169. 2005. Disponível em: http://www.manah.com.br/downloadpdf.aspx?pdf=/media/4691/dt_manah_169.pdf. Acesso em: 14 ago. 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sétimo levantamento**, Abril, 2014. Brasília, 2014. 91 p. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_27_26_boletim_graos_abril_2014.pdf. Acesso em: 14 abr. 2014.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja** – região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 264 p. (Sistemas de Produção, 15).

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja: Paraná – 2005**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224 p. (Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.5).

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação dos solos**. Brasília: Embrapa, 1999. 412 p.

FARIAS NETO, A. L.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L.; LI, S.; BOLLERO, G. A.; DIERS, B. W. Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the field. **Crop Science**, v.46, p.2547-2554, 2006.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. [S.l.: s.n.], 2006. Disponível em: http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm. Acesso: 15 jul. 2014.

GREENFIELD, P. L. The influence of method of inoculation and certain herbicides on nodulation and seed yield of soybeans. **South African Journal of Plant and Soil**, v.8, p.119-123, 1991.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina. Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

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

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & CAMPO, R. **A inoculação da soja**. Londrina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. 28p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 17; EMBRAPA-CPAC. Circular Técnica, 34)

I. A. L. - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 1985. v. 1, 533 p.

KRASOVA-WADE, T.; DIOUF, O.; NDOYE, I.; SALL, C.E.; BRACONNIER, S.; NEYRA, M. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1457-1463, 2006.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KORNODORF, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e líquida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.363-376, 2000.

MENDES, I. C.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura, em sistemas de plantio direto e convencional na Região do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 15 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa, 12).

PANG, X. P.; LETEY, J.; WU, L. Irrigation quality and uniformity and nitrogen application effects on crop yield and nitrogen leaching. **Soil Science Society of America Journal**, v.61, p.257-261, 1997.

RAMOS, M. L. G.; RIBEIRO, W. Q. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Soil**, v.152, p.145-150, 1993.

SILVA, A. D.; CARVALHO, M. D.; SCHONINGER, E.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, v.27, p.404-412, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al., 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 719.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos do Cerrado**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p.297-360.

Co-inoculação e modos de aplicação...

BRACCINI, A. L. et al. (2016)

VITTI, G. C.; CAMARGO, M. A. F.; LARA, C. **Síntese de análise químicas em tecido vegetal**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001.

ZHANG, F.; SMITH, D. L. Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry

matter yield under short season conditions. **Plant Soil**, v.179, p.233-241, 1996.

ZILLI, J. E.; RIBEIRO, K. G.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v.33, p.917-923, 2009.