

## INOCULAÇÃO DE SOJA COM *BRADYRHIZOBIUM* E *AZOSPIRILLUM* PROMOVE NODULAÇÃO PRECOCE

CHIBEBA, A.M.<sup>1,2</sup>; GUIMARÃES, M.F.<sup>1</sup>; BRITO, O.R.<sup>1</sup>; ARAÚJO, R.S.<sup>3</sup>; NOGUEIRA, M.A.<sup>2</sup>; HUNGRIA, M.<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Email: [amaral\\_chibeba@yahoo.com](mailto:amaral_chibeba@yahoo.com); <sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina-PR; <sup>3</sup>Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda, Curitiba-PR.

A inoculação da soja com estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium* para aumento da nodulação e do rendimento da soja é praticada em nível mundial há vários anos. Contudo, em solos pobres em nitrogênio (N), a soja passa por um período de deficiência de N que pode durar até 20 dias (ATKINS et al., 1989) devido à falta de sincronia entre o momento em que o N armazenado na semente esgota e o momento em que a planta inicia a utilização do N fixado biologicamente (HUNGRIA et al., 1991).

Além dos rizóbios, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) realizam uma vasta gama de processos biológicos que beneficiam as plantas, incluindo a produção de hormônios de crescimento e a fixação biológica de nitrogênio. O *Azospirillum* é a BPCP mais estudada e um dos seus efeitos é o aumento da produção de pelos radiculares e crescimento radicular, beneficiando as plantas com melhor absorção de água e nutrientes.

Uma vez que a formação dos nódulos inicia nos pelos radiculares, a hipótese deste trabalho é a de que a coinoculação da soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* resulta na formação precoce de nódulos devido ao aumento do número de pelos radiculares disponíveis para serem infectados pelo rizóbio. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da coinoculação da soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* na precocidade da nodulação da soja.

O estudo foi realizado em um ensaio conduzido em casa de vegetação e outro a campo no verão da safra 2012/13, na estação experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), localizada em Londrina (23°11'S, 51°11'W, 620 m de altitude e clima Cfa, segundo a classificação de Köpen-Geiger), no estado de Paraná, Brasil.

Nos dois ambientes foi utilizada a variedade de soja BRS 295RR. As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool a 80% por 3 minutos e imersão em hipoclorito de sódio a 10% por 4 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril. No tratamento de inoculação simples a soja foi inoculada com  $1,2 \times 10^6$  células semente<sup>-1</sup> da mistura das estirpes *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (=CPAC 15) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 (=CPAC 7), ambas contendo  $2 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>. No tratamento de coinoculação as sementes receberam inoculação adicional de  $1,2 \times 10^5$  células semente<sup>-1</sup> da mistura das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*. As amostragens das plantas foram feitas em 5 épocas, aos 15, 18, 21, 24 e 30 dias após a emergência (DAE).

O ensaio da casa de vegetação foi conduzido em vasos de Leonard modificados contendo areia e vermiculita (1:1, v:v) e solução nutritiva sem N ajustada ao pH 6,6 – 6,8 (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994). Foram semeadas 4 sementes em cada vaso e foi feito um desbaste aos 7 DAE, deixando 2 plantas por vaso.

Sessenta dias antes do início do ensaio a campo foram coletadas 20 subamostras de solo (0–20 cm) para análise das propriedades físicas (EMBRAPA, 1997), químicas (EMBRAPA, 2011) e biológicas (VINCENT, 1970; DÖBEREINER, 1995) (Tabela 1). Foi aplicado calcário para elevar a saturação por bases para 70% e pH para 5.5. Vinte dias antes da semeadura foi aplicado glifosato ( $1,5 \text{ Lha}^{-1}$ ) e imediatamente antes da semeadura foram aplicados  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  de N-P-K (0-28-20). A

semeadura foi feita à densidade de 300.000 plantas ha<sup>-1</sup> em parcelas de 4 m x 10 m, com linhas separadas por 0,5 m e pequenos terraços separando as parcelas para evitar contaminação.

Em cada época de amostragem foram coletadas todas as plantas no ensaio da casa de vegetação e no ensaio a campo foram selecionadas 5 plantas ao acaso, evitando-se as localizadas nas bordaduras. A parte aérea foi separada da raiz, na altura do nó cotiledonar, acondicionada em saco de papel e seca em estufa até peso constante. Após a determinação do peso seco (MPAS), a parte aérea foi moída para determinação de N total (NTPA), pelo método de verde de silicato (FEIJE; ANGER, 1972). As raízes foram cuidadosamente lavadas em uma peneira tendo depois sido acondicionadas em saco de papel e secas em estufa até atingirem massa constante. Depois, foram determinados o número (NN) e a massa (MNS) de nódulos secos.

Foi usado o delineamento de blocos completos casualizados com quatro repetições no ensaio da casa de vegetação, e seis repetições, no ensaio a campo, e esquema fatorial 2 x 5, em que o primeiro fator é constituído pelos inoculantes e o segundo pelas épocas de amostragem. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ). Onde foi detectado efeito dos tratamentos o teste de Tukey foi usado para comparação das médias ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram feitas com auxílio do software Sisvar.

Em geral, as plantas responderam positivamente à dupla coinoculação no ensaio da casa de vegetação, tendo sido constatado efeito significativo nos parâmetros de MNS aos 21 DAE e no NTPA aos 28 DAE (Tabela 2). No ensaio a campo o efeito do *Azospirillum* foi mais evidente, tendo sido detectadas diferenças significativas em todas as variáveis aos 21 DAE. Também foi observado que, aos 18 DAE, em condições de campo, onde estresses ambientais são frequentes, houve ganhos significativos atribuíveis ao *Azospirillum*, que variaram entre 90 e 136%. Aos 15 DAE, embora as diferenças não tenham sido significativas, a coinoculação com *Azospirillum* se traduziu em maior NN (42%), MNS (23%), MPAS (48%) e NTPA (56%) (Tabela 2).

O aumento do crescimento das plantas em resposta ao *Azospirillum* pode ser atribuído à maior disponibilidade de N devido à fixação biológica e à presença de hormônios que estimulam o crescimento. Por outro lado, o aumento da nodulação atribuível ao *Azospirillum* pode resultar das alterações causadas por esta BPCP na morfologia das raízes, como o incremento no número de pelos radiculares.

Como conclusão, tem-se que a coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* resultou em precocidade da nodulação.

### **Agradecimentos**

A.M. Chibeba é bolsista da Wageningen University através do Projeto N2Africa.

### **Referências**

- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. p.63-94.
- ATKINS, C. A.; PATE, J. S.; SANFORD, P. J.; DAKORA, F. D.; MATTHEWS, I. Nitrogen nutrition of nodules in relation to 'N-hunger' in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Plant Physiology**, v. 90, n. 4, p. 1644-1649, 1989.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212p.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230p.

FEIJE, F.; ANGER, V. Spot tests in inorganic analyses. **Analytica Chimica Acta**, v. 149, p. 363–367, 1972

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.; WALLSGROVE, R. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 7, p. 839-844, 1991.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

**Tabela 1:** Propriedades físicas, químicas e biológicas do local do ensaio.

pH	H+Al	K	Ca + Mg	SB <sup>1</sup>	P	C	V <sup>2</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> <sup>3</sup>	Diazotróficas <sup>4</sup>
(CaCl <sub>2</sub> )	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mgdm <sup>-3</sup>	gdm <sup>-3</sup>	%	células g <sup>-1</sup> solo	UFC g <sup>-1</sup> solo	
5,35	5,8	0,43	5,62	6,05	7,77	21,68	59,11	1,79 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>SB, soma de bases; <sup>2</sup>V, saturação por bases = [(K + Ca + Mg)/CTC] × 100, onde CTC = K + Ca + Mg + acidez total a pH 7,0 (H + Al). <sup>3</sup>(Vincent, 1970). <sup>4</sup>(DÖBEREINER, 1995).

Grunulometria: 71,0:8,2:20,8 (argila:silte areia).

**Tabela 2:** Número (NN) e massa de nódulos secos (MNS), massa da parte aérea seca (MPAS), e Nitrogênio total da parte aérea seca (NTPA) da soja cultivar BRS 295 RR, inoculada com *Bradyrhizobium* ou coinoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* no ensaio conduzido na casa de vegetação. Amostragens feitas aos 15, 18, 21, 24 e 30 dias após a emergência (DAE).

Tratamentos <sup>1</sup>	Época de amostragem (DAE)				
	15	18	21	24	30
NN (n° planta <sup>-1</sup> )					
Brady	15,5 c A <sup>2</sup>	20,7 c A	24,6 c A	36,9 b A	48,6 a A
Brady + Azo	21,1 c A	20,2 c A	30,5 bc A	38,8 ab A	47,0 a A
MNS (mg planta <sup>-1</sup> )					
Brady	64,8 c A	86,3 c A	96,6 c B	161,6 b A	210,6 a A
Brady + Azo	68,9 d A	81,0 d A	120,5 c A	162,8 b A	225,9 a A
MPAS (g planta <sup>-1</sup> )					
Brady	0,54 c A	0,72 c A	0,80 c A	1,56 b A	2,43 a A
Brady + Azo	0,58 d A	0,64 cd A	0,94 c A	1,58 b A	2,49 a A
NTPA (mg N planta <sup>-1</sup> )					
Brady	16,65 c A	26,60 c A	24,59 c A	51,91 b B	78,99 a A
Brady + Azo	20,83 b A	23,14 b A	30,56 b A	68,52 a A	78,27 a A

<sup>1</sup>Brady = *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 e B. *diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080; Azo = *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6;

<sup>2</sup>Médias de seis repetições. Quando seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna e, para este caso, para cada parâmetro e época, não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

**Tabela 3:** Número (NN) e massa de nódulos secos (MNS), massa da parte aérea seca (MPAS), e nitrogênio total da parte aérea seca (NTPA) da soja, cultivar BRS 295 RR, inoculada com *Bradyrhizobium* ou coinoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* no ensaio a campo. Amostragens feitas aos 15, 18, 21, 24 e 30 dias após a emergência (DAE).

Tratamentos <sup>1</sup>	Época de amostragem (DAE)				
	15	18	21	24	30
NN (n° planta <sup>-1</sup> )					
Brady	10,8 c A	15,2 bc A	18,3 bc B	20,2 ab B	26,2 a A
Brady + Azo	15,3 b A	20,4 b A	30,5 a A	33,2 a A	35,0 a A
MNS (mg planta <sup>-1</sup> )					
Brady	31,2 c A	43,2 bc B	45,6 bc B	63,8 ab B	88,2 a B
Brady + Azo	38,4 d A	82,0 c A	115,2 b A	123,4 b A	155,8 a A
MPAS (g planta <sup>-1</sup> )					
Brady	0,46 c A	0,52 c B	1,51 b B	2,03 b A	2,98 a A
Brady + Azo	0,68 c A	1,12 c A	2,21 b A	2,68 b A	3,53 a A
NTPA (mg N planta <sup>-1</sup> )					
Brady	13,7 c A	16,6 c B	46,8 c B	71,1 b B	104,3 a B
Brady + Azo	21,4 b A	39,2 b A	79,6 b A	104,5 a A	137,7 a A

<sup>1</sup>Brady = *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 e *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080; Azo = *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6;

<sup>2</sup>Médias de seis repetições. Quando seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna e, para este caso, para cada parâmetro e época, não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).