

INFLUÊNCIA DA COINOCULAÇÃO DE SOJA COM *Bradyrhizobium* E DIFERENTES CEPAS DE *Azospirillum* EM PARÂMETROS DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

BÁRBARO-TORNELI, Ivana Marino¹; FINOTO, Everton Luis²;
GONÇALVES, Elaine Cristine Piffer¹; SILVA, José Antônio Alberto da³;
MIGUEL, Fernando Bergantini³; FARIA, Marcelo Henrique de³

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.4130

RESUMO: Objetivou-se avaliar a eficiência em parâmetros de fixação biológica de nitrogênio (FBN) de novas cepas de *Azospirillum brasilense* para coinoculação com *Bradyrhizobium* em soja. Os tratamentos foram: 1 - controle negativo sem inoculante; 2 - controle positivo com 200 kg ha⁻¹ de fertilizante químico nitrogenado; 3 - inoculação com *Bradyrhizobium* (B); 4 - coinoculação de B com *Azospirillum brasilense*; 5 - coinoculação B + cepa 1; 6 - coinoculação de B + cepa 2; 7 - coinoculação de B + cepa 3; 8 - coinoculação de B + cepas 1, 2 e 3. No florescimento foram coletadas 5 plantas por parcela experimental. Os parâmetros avaliados foram: número e massa seca de nódulos na raiz principal (NNOP, MSNOP), nas raízes secundárias (NNOS, MSNOS) e total (NNOT, MSNOT); massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Em relação ao NNOS e NNOT o tratamento 4 propiciou maior incremento de nódulos nas raízes secundárias e total de respectivamente 25 e 31,87 nódulos planta⁻¹ em relação aos demais testados. Para NNOP os tratamentos 3 e 4, foram semelhantes com médias de 6,7 e 6,87 nódulos planta⁻¹, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com outras cepas de *Azospirillum* (5, 6 e 7). Já, para MSNOP, MSNOS E MSNOT o 4 e 3 destacaram-se e foram superiores aos tratamentos (5, 6, 7 e 8). Quanto a MSR e MSPA, a fertilização química nitrogenada (2) sobressaiu-se estatisticamente tendo o primeiro parâmetro semelhança estatística ao tratamento 4 e o segundo ao 8. Pode-se concluir que as novas cepas não se destacaram nas variáveis de FBN, sendo a coinoculação com *Azospirillum brasilense* mais eficiente.

Palavras-chave: Seleção de estirpes. Inoculação mista. *Glycine max*.

INFLUENCE OF COINOCULATION OF SOYBEAN WITH *Bradyrhizobium* AND DIFERENT STRAINS OF *Azospirillum* ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION PARAMETERS

SUMMARY: The objective was to evaluate the efficiency in parameters of biological nitrogen fixation (BNF) of new strains of *Azospirillum* for coinoculation with *Bradyrhizobium* in soybean. For this, a field experiment was set up with the following treatments: 1 - negative control without inoculant; 2 - positive control with 200 kg ha⁻¹ of chemical nitrogen fertilizer; 3 - inoculation with *Bradyrhizobium* (B); 4 - coinoculation of B with *Azospirillum brasilense*; 5 - coinoculation B + strain 1; 6 - coinoculation B + strain 2; 7 - coinoculation B + strain 3 and 8 - coinoculation B + strains 1, 2 and 3. At flowering, 5 plants were collected per experimental plot. The evaluated parameters were: number and dry mass of nodules on the main root (NMR, DMMR), on the secondary roots (NSR, DMSR) and total (NTR, DMTR); dry mass of aerial part (DMAP) and of the root (DMR). In relation to NSR and NTR, treatment 4 provided a greater increment of nodules in the secondary roots and a total of respectively 25 and 31,87 nodules plant⁻¹ in relation to the others tested. For NMR treatments 3 and 4 were similar with means of 6,7 and 6,87 nodules plant⁻¹, not statistically different from treatments with other *Azospirillum* strains (5, 6 and 7). As for DMMR, DMSR and DMTR, 4 and 3 stood out in relation to these parameters and were superior to treatments (5, 6, 7 and 8). Only for DMR and DMAP chemical nitrogen fertilization (2) stood out statistically, with the first parameter statistically similar to treatment 4 and second to treatment 8. It can be concluded that the new strains did not stand out in the parameters of BNF, with coinoculation with *Azospirillum brasilense* more efficient.

Keywords: Lineage selection, Mixed inoculation, *Glycine max*.

¹ Pesquisadora Científica, Dra. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) Regional - Unidade de Pesquisa de Colina, Colina/SP;

² Pesquisador Científico, Dr. - APTA Regional - Unidade de Pesquisa de Pindorama, Pindorama/SP;

³ Pesquisador Científico, Dr. - APTA Regional - Unidade de Pesquisa de Colina, Colina/SP.

INTRODUÇÃO

O Brasil e a Argentina ocupam posição de destaque quando o tema é o desempenho satisfatório do processo de fixação biológica de nitrogênio em soja, sendo que esta prática permite a obtenção de produtividades que ultrapassam 5000 kg ha⁻¹ (Libório, 2019).

Com a finalidade de maximizar os ganhos obtidos com a inoculação, a mais de uma década, foi validada pela pesquisa uma nova ferramenta, denominada de coinoculação ou inoculação mista. Essa prática consiste na junção de inoculantes contendo as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e do gênero *Azospirillum brasilense*.

O gênero *Azospirillum* pertence ao grupo das bactérias promotoras de crescimento vegetal de plantas (BPCP), que possuem como principais características a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, o aumento da atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas e a produção de fitohormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (Tien *et al.*, 1979; Botini *et al.*, 1989; Strzelczyk; Kampert, 1994; Cassán *et al.*, 2008; Huergo *et al.*, 2008). Nesse gênero específico de bactérias, não existe o estímulo para produção de nódulos nos vegetais, optando por colonizar áreas superficiais (Tortora *et al.*, 2012), ou mesmo, se locomover internamente via xilema e floema (Roncato-Maccari *et al.*, 2003).

As auxinas ou mais especificamente o ácido 3-indol acético (AIA), apresentam diversas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas, estando presente na maioria dos estádios do ciclo de vida de um vegetal, da germinação a senescência. Este grupo hormonal regula alguns processos, tais como: dominância apical, abscisão foliar, formação de raízes laterais e diferenciação vascular (Taiz; Zeiger, 2013). Por sua vez, giberelinas e citocininas (Glick, 2012), estão diretamente ligadas ao alongamento celular e a juvenilidade da planta, acarretando incremento de porte e longevidade do vegetal.

Os inoculantes a base de bactérias do gênero *Azospirillum* foram inicialmente comercializados para inoculação em milho e trigo (Ferlini, 2006, Hungria *et al.* 2013; EMBRAPA, 2014). Posteriormente, para coinoculação em soja, a inserção de *A. brasilense*, pode proporcionar incrementos de até 16% na produtividade de grãos (Hungria; Nogueira, 2014).

Estudos conduzidos em campo, conjecturam que a coinoculação em soja proporciona diversos benefícios, tais como: aumento da área radicular possibilitando um melhor aproveitamento de fertilizantes, além de favorecer a planta em situações de estresse hídrico e também, atua no incremento de produtividade, devido a maior capacidade de absorção de água e nutrientes pelas raízes (Hungria; Nogueira, 2014). Podem operar também como agentes de controle biológico por induzirem resistência sistêmica na planta (Bashan *et al.*, 2014).

Os mecanismos de ação do *Bradyrhizobium* e do *Azospirillum* são diferentes. No caso do último, os benefícios advêm da fixação biológica de nitrogênio, como já supracitado, no entanto, sua maior eficiência se dá em função da síntese de fitohormônios de crescimento vegetal (Spaepen; Vanderleyden, 2015). Deste modo, um sistema radicular mais volumoso, propicia melhor absorção e/ou aproveitamento de água e nutrientes, sendo notado também, uma maior resistência ao estresse hídrico (Fukami *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2017). Em relação aos nutrientes, observa-se maior vigor das plantas (Ardakani *et al.*, 2011).

Em pesquisas realizadas por Hungria *et al.* (2013), Embrapa (2014), Hungria *et al.* (2015), Bárbaro *et al.* (2009), Bárbaro *et al.* (2017), Bárbaro *et al.* (2018a,b), Dourado *et al.* (2018) e Galindo *et al.* (2018) foram verificadas influências positivas da coinoculação sobre características agronômicas de soja, porém, nos resultados de pesquisa obtidos por Gitti *et al.* (2012), Zuffo *et al.* (2016), Finoto *et al.* (2017) e Mundim *et al.* (2018) não foram verificadas diferenças significativas com o uso da prática.

Diante do exposto, novas cepas de *Azospirillum* vem sendo pesquisadas, visando obtenção de maior eficiência, que as estirpes AbV5 e AbV6, atualmente utilizadas nos inoculantes comerciais. Segundo informações da UFPR (2020), no Laboratório do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, foram selecionadas novas estirpes de *Azospirillum brasilense* capazes de excretar grandes quantidades de amônio (HM053 e HM210) e com maior resistência a estresse oxidativo (IH1) que estão sendo oferecidas, em caráter não exclusivo, para desenvolvimento de novos inoculantes e ensaios de eficiência agrícola em campo. As estirpes oferecidas não são transgênicas e foram melhoradas utilizando métodos genéticos e bioquímicos tradicionais.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar em condições de campo a viabilidade e eficiência em parâmetros de fixação biológica de nitrogênio (N) dessas novas cepas de *Azospirillum brasilense* para coinoculação com *Bradyrhizobium* em soja.

MATERIAL E MÉTODO

Local de condução do experimento

O experimento foi instalado em condições de campo, em 25 de novembro de 2019, na Unidade de Pesquisa de Pindorama, vinculado a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), localizado no município de Pindorama/SP. O relevo da região é ondulado com altitudes que variam de 498 a 594 m, cujas coordenadas geográficas são 21° 13' de latitude sul e 48° 55' de longitude oeste. A área onde o experimento foi instalado consta de um histórico de dezessete anos de pastagem.

O clima enquadra-se, segundo a Classificação Climática de Köppen (1948), em Aw, definido como clima mesotérmico de inverno seco, onde a temperatura média do mês mais frio é abaixo de 18 °C e do mês mais quente, acima de 22 °C.

Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos testados, utilizados no presente trabalho estão descritos na Tabela 1.

A parcela experimental foi de 8 linhas de 6 m de comprimento, e espaçamento entre linhas de 0,5 m. Desta forma, o delineamento experimental foi o de blocos ao acaso composto pelos oito tratamentos acima citados com 6 repetições, num total de 48 parcelas experimentais. Para isso foi utilizada semeadora adubadora composta por 8 linhas.

Tabela 1. Tratamentos testados no experimento de coinoculação com *Bradyrhizobium* e novas cepas de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*. Pindorama- SP. Safra 2019/20.

Código	Tratamentos
1	Controle negativo - ausência de fertilizante nitrogenado e inoculação;
2	Controle positivo - fertilização química nitrogenada - 200 kg de N ha ⁻¹ parcelados;
3	Controle Padrão - inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> ^(a,b)
4	Controle Coinoculação: <i>Bradyrhizobium</i> + <i>Azospirillum</i> ^(a,b)
5	Coinoculação: <i>Bradyrhizobium</i> ^(a) + CEPA 1(UFPR) ^(b)
6	Coinoculação: <i>Bradyrhizobium</i> ^(a) + CEPA 2(UFPR) ^(b)
7	Coinoculação: <i>Bradyrhizobium</i> ^(a) + CEPA 3(UFPR) ^(b)
8	Coinoculação: <i>Bradyrhizobium</i> ^(a) + CEPA 1 + 2 + 3 ^(b)

^(a) os inoculantes foram padronizados, codificados e fornecido pela ANPIL; ^(b) a mistura dos inoculantes foi realizada no momento da instalação dos experimentos; cepa 1 - IH1 (UFPR- Universidade Federal do Paraná); cepa 2 - HM053 (UFPR); cepa 3 - HM210 (UFPR).

Condução do experimento

Antes da instalação foram coletadas amostras de solo da área experimental para posterior análise química e granulométrica, além da contagem de bactérias *Bradyrhizobium* e bactérias diazotróficas associativas do solo antes da semeadura. É importante ressaltar que o histórico da área onde o experimento foi conduzido, consta de 17 anos de pastagem, e o preparo do solo foi convencional. A contagem das bactérias foi realizada no Laboratório de Microbiologia Agrícola da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal/SP de acordo com as recomendações de Dobereiner *et al.* (1995).

Amostras de solo para caracterização química (van RAIJ *et al.*, 2001) e granulométrica (DAY, 1965) foram coletadas em setembro de 2019, na camada de 0-0,2 m de profundidade, e os resultados obtidos foram: pH (CaCl₂) = 5,59; M.O. = 15,62 g dm⁻³; CO = 9,08 g dm⁻³; P = 10,29 mg dm⁻³; K = 3,40 mmol_c dm⁻³; Ca = 14,35 mmol_c dm⁻³; Mg = 4,57 mmol_c dm⁻³; S = 5,46 mg dm⁻³; H + Al = 10,76 mmol_c dm⁻³; V = 67,48%, Areia Total = 892 g kg⁻¹ de solo; Argila = 72 g kg⁻¹ de solo e Silte = 36 g kg⁻¹ de solo, sendo o preparo do solo convencional.

A adubação de semeadura foi realizada com adubo formulado 0-20-20, na dose de (300 kg ha⁻¹). Apenas no Tratamento 2, controle positivo (200 kg ha⁻¹ de N) foram aplicados manualmente o restante da dose de N, sendo metade na base e metade em cobertura com o uso da fonte ureia, aos 35 dias após a emergência.

A cultivar de soja utilizada foi a TMG 7062 IPRO com tecnologia INOX. Esta cultivar apresenta tipo de crescimento semideterminado, cor da flor branca, cor da pubescência cinza; cor do hilo marrom clara; exigência de fertilidade média-alta; acamamento de moderadamente resistente a resistente; o peso de mil grãos varia de 160 a 205 g, com resistência ao cancro da haste, ferrugem asiática, mancha olho de rã, pústula bactéria, podridão radicular de fitóftora (raça 1), moderadamente resistente ao oídio e suscetível ao nematoide das galhas, nematoides das lesões radiculares e do cisto. Em São Paulo a época de semeadura preferencial é de outubro a novembro (TMG, 2020). Foram semeadas 20 sementes m⁻¹, com uso de semeadora de parcelas experimentais, com a finalidade de se obter 15 plantas m⁻¹. Para isto, foi realizado o desbaste.

Assim, no laboratório, antes da semeadura com antecedência de 4 horas da aplicação dos inoculantes foram realizados os procedimentos visando tratamento das sementes com o pacote tecnológico da Basf: composto pelo produto comercial Standak[®] Top na dose de 2 mL kg⁻¹ de semente, sendo esse utilizado em todos os tratamentos testados. O Standak[®] Top oferece proteção do potencial genético das sementes de soja. O produto tem funções múltiplas e complementares no seu efeito inseticida e fungicida, blindando as sementes contra o ataque de pragas e doenças de solo que interferem no processo de germinação e de plântulas em desenvolvimento na lavoura de soja. A solução possui três princípios ativos distintos, e conferem alta eficiência para o manejo de pragas como lagarta-elasma, coró e tamanduá-da-soja. Standak[®] Top também oferece maior tolerância ao estresse hídrico e a ocorrência de nematoides (BASF, 2019).

As doses dos respectivos inoculantes fornecidos pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculante (ANPII) utilizados nos tratamentos 3 a 8, seguem descritos a seguir: inoculante a base de *Bradyrhizobium* - 100 mL ha⁻¹; inoculante a base de *Azospirillum brasilense* - 100 mL ha⁻¹; Inoculante a base de *Azospirillum brasilense* cepa IHI - 100 mL ha⁻¹; Inoculante a base de *Azospirillum brasilense* cepa HM 210 - 100 mL ha⁻¹; Inoculante a base de *Azospirillum*

brasiliense cepa HM053 - 100 mL ha⁻¹; inoculante a base de *Azospirillum brasiliense* cepas (IHI, HM053 e HM210) - 100 mL ha⁻¹.

Foram adotados alguns cuidados para garantir uma maior eficiência dos inoculantes, como inoculação das sementes realizada à sombra e distribuição uniforme dos inoculantes em todas as sementes. Assim, não houve contato direto dos inoculantes com os fungicidas utilizados no tratamento de sementes. Além disso, ressalta-se que a mistura das estirpes foi realizada no momento da instalação do experimento. Para isto, foi utilizado recipiente devidamente higienizado, sendo retirado de cada bag de cada estirpe, o volume de 200 mL ha⁻¹ e o mesmo foi adicionado no recipiente supracitado.

Foi aplicado 35 g de Mo e 3,5 g de Co (produto fornecido pela ANPII) na dose de 150 mL ha⁻¹ em cada uma das aplicações realizadas nos estádios de desenvolvimento V3/V4 e outra em R1 via pulverização foliar (Fehr; Caviness, 1977), em todos os tratamentos incluindo o controle. Também foi efetuado o controle de doenças e pragas por meio de fungicidas e inseticidas quando necessário.

Todas as técnicas de cultivo da soja, como escolha de cultivar, época de semeadura, população de plantas, controle de plantas daninhas, insetos e doenças seguiram as recomendações técnicas para a cultura da soja da EMBRAPA (2013).

Avaliações

Avaliações no estágio reprodutivo - florescimento

No florescimento foram coletadas 5 plantas na segunda linha de cada parcela experimental. Deste modo, os parâmetros avaliados foram: número de nódulos, sendo número de nódulos na raiz principal (NNOP), nas raízes secundárias (NNOS) e total (NNOT); massa de nódulos secos na raiz principal (MSNOP), nas raízes secundárias (MSNOS) e total (MSNOT) em mg planta⁻¹; massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) em g planta⁻¹, além da altura da planta no florescimento (APF) em cm.

Análise estatística dos resultados

Para os parâmetros e componentes de produção foram realizadas as transformações Box-Cox estimadas e aplicadas como proposto por Hawkins e Weisberg (2017), sendo os valores das médias mantidos na escala original. Já as variâncias, desvios padrões, coeficientes de variação, diferenças mínimas significativas (DMS), análises de variância e comparações de médias foram calculados com os dados transformados. Posteriormente foram verificadas a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade (Royston, 1995). E também a

Homocedasticidade por meio da homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene a 5% de probabilidade (Gastwirth *et al.*, 2009). Quando diferenças significativas foram detectadas na análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram executadas com auxílio do Software AgroEstat versão online (Maldonado Junior, 2019).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, encontram-se os resultados médios obtidos nos parâmetros relacionados à fixação biológica de N avaliados no florescimento. Pelo teste F foram detectadas significâncias estatísticas altamente significativas ($p \leq 0,01$) para todas as variáveis analisadas, com exceção a APF cuja significância foi a 5%.

Quando se analisa o NNOP, observa-se que os tratamentos 3 (inoculação padrão com *Bradyrhizobium*) e 4 (Coinoculação padrão: *Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) destacaram-se, com respectivamente, 6,70 e 6,87 nódulos planta⁻¹ e, portanto, foram os que mais incrementaram a quantidade de nódulos na raiz principal não diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey dos tratamentos 5, 6 e 7, com respectivamente médias de 3,93, 5,53 e 3,83 nódulos planta⁻¹, sendo estes estatisticamente superiores aos demais tratamentos testados. O Tratamento 8 que fez uso de inoculação mista de *Bradyrhizobium* associadas com as três cepas de *Azospirillum* deteve valor médio intermediário de (3,57 nódulos), sendo equivalente estatisticamente aos tratamentos 5 (*Bradyrhizobium* + cepa 1), 6 (*Bradyrhizobium* + cepa 2) e 7 (*Bradyrhizobium* + cepa 3) e superiores aos controles negativo e positivo (1 e 2). Esses dois últimos tratamentos foram os que apresentaram menores quantidades de nódulos na raiz principal. Considerando o NNOS, o tratamento 4 (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) apresentou maior produção de nódulos nas raízes secundárias com média de 25 nódulos planta⁻¹, quando comparado aos demais tratamentos testados. Com valores médios intermediários posicionaram os tratamentos 3, 5 e 8 que foram equivalentes estatisticamente, apesar de não diferirem do tratamento 6. Logo em seguida, destacou-se o tratamento 7 que apesar de ter tido igualdade estatística em relação ao 6, foi estatisticamente superior aos tratamentos aos controles positivo e negativo, que obtiveram os menores valores médios de nódulos nas raízes secundárias, com respectivamente 3,43 e 2,17 nódulos planta⁻¹.

Tabela 2. Parâmetros avaliados no início do florescimento no experimento de coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* e novas cepas de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*. Ano Agrícola 2019/20. Pindorama/SP.

Tratamentos ^(a)	NNOP ^{(b)1}	NNOS ^{(c)1}	NNOT ^{(d)1}	APF ^{(e)1}	MSPA ^{(f)1}	MSR ^{(g)1}	MSNOP ^{(h)1}	MSNOS ⁽ⁱ⁾¹	MSNOT ^{(j)1}
	----- planta ⁻¹ -----			cm	----- g planta ⁻¹ -----		----- mg planta ⁻¹ -----		
1	1,33 c ^(l)	3,43 d	4,77 de	59,67 ab	11,40 c	2,27 bcd	13,37 e	33,07 e	46,33 d
2	0,37 c	2,17 d	2,53 e	72,50 a	21,53 a	3,28 a	3,57 f	24,53 e	28,10 e
3	6,70 a	9,13 b	15,83 b	60,67 ab	13,00 c	2,79 ab	138,40 ab	158,37 a	296,77 a
4	6,87 a	25,00 a	31,87 a	60,33 ab	14,27 bc	3,06 a	168,50 a	145,80 ab	314,30 a
5	3,93 ab	8,43 b	12,37 bc	59,67 ab	13,80 bc	2,73 abc	53,63 d	77,63 cd	131,27 c
6	5,53 ab	7,63 bc	13,17 bc	66,50 ab	11,67 c	2,06 d	94,00 bc	111,40 bc	205,40 b
7	3,83 ab	4,53 cd	8,37 cd	57,67 b	12,40 c	2,14 cd	111,37 bc	66,33 d	177,70 bc
8	3,57 b	11,77 b	15,33 b	59,67 ab	18,60 ab	2,31 bcd	79,80 cd	109,97 bc	189,77 b
F	31,89**	40,75**	45,29**	2,66*	11,11**	9,86**	102,19**	50,25**	120,13**
CV (%)	19,33	23,19	17,46	24,39	5,48	13,52	7,34	9,50	4,71
Média	4,02	9,01	13,03	62,08	14,58	2,58	82,83	90,89	173,72

^(a) 1: Controle negativo - ausência de fertilizante nitrogenado e inoculação; 2: Controle positivo - fertilização química nitrogenada - 200 kg de N ha⁻¹ parcelados; 3: Controle Padrão - inoculação com *Bradyrhizobium*⁽²⁾; 4: Controle Coinoculação - *Bradyrhizobium* + *Azospirillum*⁽²⁾; 5: Coinoculação - *Bradyrhizobium*⁽²⁾ + IH1⁽²⁾(UFPR)⁽³⁾; 6: Coinoculação - *Bradyrhizobium*⁽²⁾ + HM053⁽²⁾(UFPR)⁽³⁾; 7: Coinoculação - *Bradyrhizobium*⁽²⁾ + HM 210⁽²⁾(UFPR)⁽³⁾; 8: Coinoculação - *Bradyrhizobium*⁽²⁾ + (IH1 + HM053 + HM210)⁽³⁾; ^(b) Número de nódulos na raiz principal; ^(c) Número de nódulos nas raízes secundárias; ^(d) Número de nódulos total; ^(e) Altura de planta no florescimento; ^(f) Massa seca da parte aérea; ^(g) Massa seca da raiz; ^(h) Massa de nódulos da raiz principal; ⁽ⁱ⁾ Massa seca de nódulos das raízes secundárias; ^(j) Massa seca de nódulos total; ^(l) Média seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ** significativo a 1%; * significativo a 5%. ¹ Média respectivamente de cinco plantas por repetição. ⁽²⁾ Os inoculantes foram padronizados, codificados e fornecidos pela ANPII; ⁽³⁾ A mistura dos inoculantes foi realizada no momento da instalação dos experimentos.

E em relação ao NNOT, nota-se que o tratamento 4, que correspondeu a aplicação da coinoculação padrão, também propiciou a maior produção de nódulos (31,87 nódulos totais planta⁻¹) em relação aos demais tratamentos testados. Posicionados de maneira intermediária ficaram os tratamentos 3 (inoculação padrão com *Bradyrhizobium*), 5 (*Bradyrhizobium* + cepa 1), 6 (*Bradyrhizobium* + cepa 2) e 8 (*Bradyrhizobium* + cepas 1 + 2 + 3) que mostraram igualdade estatística com respectivamente 15,83, 12,37, 13,17 e 15,33 nódulos planta⁻¹. Para o tratamento 7 (*Bradyrhizobium* + cepa 3) foi observado que, apesar da semelhança estatística com 5 e 6, o mesmo foi inferior estatisticamente aos demais tratamentos citados quanto a esse parâmetro. O tratamento 2 que correspondeu ao controle positivo com fertilização química nitrogenada mostrou menor valor médio quanto ao NNOT (2,53 nódulos), não diferindo do tratamento 1, controle negativo, com 4,77 nódulos.

Em relação à massa seca nodular, para MSNOP, o tratamento 4, que fez uso da coinoculação padrão (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*), destacou-se com maior massa seca nodular na raiz principal (168,5 mg planta⁻¹) não diferindo estatisticamente do tratamento 3 (inoculação padrão com *Bradyrhizobium*), que mostrou valor médio de 138,4 nódulos planta⁻¹, sendo ambos estatisticamente superiores aos demais tratamentos testados. Com valores médios intermediários posicionaram os tratamentos 6 (*Bradyrhizobium* + cepa 2) e 7 (*Bradyrhizobium* + cepa 3), com respectivamente, 94,0 e 111,37 mg planta⁻¹, que foram superiores aos demais tratamentos testados inclusive os que também fizeram uso de coinoculação de *Bradyrhizobium* associado a cepa 1 tratamento 5 e 8 (cepas 1 + 2 + 3) que foram equivalentes entre si, com médias de respectivamente (53,63 e 79,8 mg planta⁻¹). Os tratamentos que apresentaram os menores valores médios para MSNOP foram o tratamento 1 com 13,37 mg, que diferiu pelo teste de Tukey do 2 (3,57 mg planta⁻¹). Para MSNOS, os tratamentos 3 e 4 não diferiram entre si e destacaram-se com média de tratamentos de 152,09 mg planta⁻¹. Os tratamentos 6 e 8 mostraram valores médios intermediários de MSNOS e foram superiores estatisticamente ao tratamento 7 que não diferiu significativamente do 5. Com menores valores quanto a esse parâmetro ficaram também posicionados os tratamentos 1 e 2 que foram equivalentes estatisticamente entre si, com médias de respectivamente 33,07 e 24,53 mg planta⁻¹. Para MSNOT verificou-se que os tratamentos 4 e 3 foram equivalentes entre si com 296,77 e 314,3 mg planta⁻¹ e superiores aos outros tratamentos testados. Logo em seguida posicionaram os tratamentos 6, 7 e 8 com valores médios intermediários, de respectivamente, 205,40,

177,70 e 189,77 mg planta⁻¹. Os piores tratamentos quanto à biomassa de nódulos totais foram, em ordem crescente, 2, 1 e 7, com respectivamente 28,10, 46,33 e 131,27 mg planta⁻¹.

Os resultados obtidos para os tratamentos 3, 4 e 8 corroboram com estudos que mencionam que uma nodulação adequada está na faixa de 15 e 30 nódulos totais e, para os tratamentos 4, 3, 5, 6, 7 e 8, corroboram com estudos que mencionam que biomassa de nódulos totais entre 100 a 200 mg é suficiente para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (Hungria *et al.*, 2007; Brandelero *et al.*, 2009, Barbaro *et al.*, 2009).

A média geral do experimento para altura de planta no florescimento (APF) para a cultivar TMG 7062 IPRO foi de 62,08 cm (Tabela 2). Os tratamentos testados de modo geral não diferiram entre si, com exceção do 7 com 57,67 cm, que foi estatisticamente inferior ao tratamento 2 que obteve a maior APF (72,50 cm). Silva *et al.* (2011), em pesquisa que envolveu doses de inoculante e N na semeadura da soja em área de primeiro cultivo, verificaram que a altura de plantas na maturação não foi influenciada pelas doses de inoculante e N mineral aplicadas no primeiro ano de cultivo. Jendiroba e Câmara (1994), trabalhando com inoculação e adubação nitrogenada em solo sem histórico de cultivo de soja, não observaram efeito significativo para a altura de plantas. Campos (1999) também não obteve resposta significativa para essa variável, quando foram utilizadas doses diferenciadas de inoculante.

Ainda na Tabela 2, com relação a MSR, os tratamentos 2 com 3,28 g planta⁻¹, 4 com 3,06 g, 3 com 2,79 g e 5 com 2,73 g tiveram igualdade estatística e proporcionaram os maiores acréscimos em termos de biomassa seca radicular quando comparados aos demais tratamentos. Já o tratamento 6 mostrou o menor valor médio de MSR, que foi de 2,06 g. Quanto a MSPA, nota-se que o tratamento 2, que fez uso da fertilização química nitrogenada, foi o que mais incrementou a biomassa seca da parte aérea, apresentando média de 21,53 g planta⁻¹, apesar de não diferir estatisticamente do tratamento 8, que consistiu do uso da prática de coinoculação de *Bradyrhizobium* associada as três novas cepas de *Azospirillum brasilense*, com valor médio de 18,6 g planta⁻¹. Os tratamentos 4 e 5 foram equivalentes estatisticamente, e obtiveram valores médios intermediários de respectivamente, 14,27 e 13,18 g planta⁻¹. Por sua vez, os tratamentos 1, 3, 6 e 7 tiveram igualdade estatística e obtiveram os menores valores médios para MSPA.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho para os parâmetros avaliados, nota-se que é recomendado novos experimentos para comprovar a eficiência dessas novas cepas de *Azospirillum* utilizadas.

A coinoculação padrão (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) influenciou positivamente no incremento da maioria dos parâmetros relacionados a fixação biológica de nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

A Vittia Fertilizantes e Biológicos S/A pelo aporte financeiro via FUNDAG.

REFERÊNCIAS

ARDAKANI, M. R.; MAZAHERI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp, *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 181–192, 2011.

BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BARBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Produtividade da soja em resposta á inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 01-07, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5747/ca.2009.v05.n1.a0040>

BÁRBARO, I. M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A.; LIBÓRIO, P. H. S.; MASSARO SOBRINHO, R.; FINOTO, E. L.; MATEUS, G. P.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R. S. Viabilidade Técnica e Econômica da co-inoculação de soja no estado de São Paulo. **Nucleus**, v. 1, p. 45-58, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.2819>

BÁRBARO-TORNELI, I. M.; FINOTO, E. L. BORGES, W. L. B.; TOKUDA, F. S.; SANTOS, G. X. L.; MARTINS, M. H.; CORDEIRO-JÚNIOR, P. S.; PASQUETTO, J. V. G.; GASPARINO, A. C.; FREITAS, R. S.; MATEUS, G. P.; HIPÓLITO, J. L.; CAZENTINI-FILHO, G.; CASTELETI, M. L. Avaliação de cultivares de soja no estado de São Paulo em resposta à aplicação de inoculantes no sulco de semeadura. **Nucleus** v. 1, p. 55-62. 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.3001>

BÁRBARO-TORNELI, I.M.; FINOTO, E. L.; TOKUDA, F. S.; MEDEIROS, C. N. F.; GASPARINO, A. C.; BORGES, W. L. B.; FREITAS, R. S.; MATEUS, G. P.; HIPÓLITO, J. L.; CAZENTINI-FILHO, G.; CASTELETI, M. L. Influência de Modos de aplicação da co-inoculação no desempenho agrônômico de soja. **Nucleus**, v. 1, p. 105-114. 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.3008>

BASF (2019). Proteção e cultivo de sementes. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/Proteção-de-Cultivos/Standak-Top.html>

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2009v30n3p581>

CAMPOS, B. C. Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 423-426, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781999000300007>

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, v. 1, p. 59-84, 2008.

DAY, P. R. Particle fractionation and particle-size analysis. In: BLAKE, C. A. *et al.* (Ed.). **Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical properties, including statistics of measurement and sampling**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 545-567. (Part.1).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Distrito Federal: Embrapa SPI, 1995. 60 p.

DOURADO, D. P.; PELUZIO, J. M.; REINA, E.; ALBERNAS, K. K.; LÁZARI, T. M.; MURAIISHI, C. T. Protein content in *Glycine max* grains influenced by the mixed inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. **Journal of bioenergy and food Science**, v. 5, p. 32-43, 2018.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja. Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de coinoculação combina alto rendimento com sustentabilidade na produção de soja e do feijoeiro**. 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1580416/tecnologia-de-coinoculacao-combina-altorendimento-com-sustentabilidade-na-producao-de-soja-e-do-feijoeiro>

FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p. (Special Report, 80)

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos–Agricultura**, 2006.

FINOTO, E. L.; JÚNIOR, P. S. C.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; MARTINS, M. H.; SOARES, M. B. B.; MARTINS, A. L. M. Desenvolvimento e produção de soja co-inoculada com *Azospirillum brasilense* em semeadura direta sobre palhico de cana crua **Nucleus** v.1, p.9-14. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.2815>

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 153, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>

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

GASTWIRTH, J. L.; GEL, Y. R.; MIAO, W. The Impact of Levene's Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice. **Statistical Science**, v. 24, n. 3, p. 343-360. Disponível em: <https://doi.org/10.1214/09-STS301>

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. **Agrarian**, v. 5, p. 36-46, 2012.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 963401, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

HAWKINS, D. M.; WEISBERG, S. Combining the box-cox power and generalised log transformations to accommodate nonpositive responses in linear and mixed-effects linear models. **South African Statistical Journal**, v. 51, n. 2, p. 317-328, 2017.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35.

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

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologia de coinoculação: rizóbios e *Azospirillum* em soja e feijoeiro**. Embrapa Soja. Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E). 2014.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

JENDIROBA, E.; CÂMARA, G. M. S. Rendimento agrícola da cultura da soja sob diferentes fontes de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 1201- 1209, 1994.

KOOPEN, W. **Climatologia**. Buenos Aires: Gráfica Panamericana. 1948. 478 p.

LIBORIO, P. H. S. **Desempenho simbiótico e produtivo de cultivares de soja submetidas a co-inoculação com *Azospirillum***. 2019. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.

MALDONADO JUNIOR, W. **Programa Estatístico AgroEstat**. 2019. Disponível em: <https://www.agroestat.com.br>

MARQUES, A. C. R.; OLIVEIRA, L. B.; NICOLOSO, F. T.; JACQUES, J. S.; GIACOMINI, S. J.; QUADROS, F. L. F. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54–62, 2017.

MUNDIM, L. M. F. ROCHA, D. K.; REIS, C. F.; CARVALHO, E. R. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* via sementes de soja no cerrado. **Global Science and technology**, v. 11, n. 3, p. 10-19. 2018.

RONCATO-MACCARI, L. D.; RAMOS, H. J.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00108-9)

ROYSTON, P. Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W-test for Normality. **Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)**, v. 44, n. 4, p. 547-551, 1995.

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

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis. In: BRUIJN, F. J. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**, p. 937-940, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch91>

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

TMG. **SOJA TMG 7062 IPRO**. 2020. Disponível em: <http://www.tmg.agr.br/ptbr/cultivar/tmg-7062-ipro-2020>.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and soil**, v. 356, p. 279-290, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0916-6>

UFPR. Ciência e Tecnologia. 2020. **Oportunidade de Licenciamento para Pesquisa, Desenvolvimento, Uso e Exploração Comercial**. Disponível em: <https://www.ufpr.br/porta.ufpr/noticias/oportunidade-de-licenciamento-para-pesquisa-desenvolvimento-uso-e-exploracao-comercial>

van RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Eds). **Análise química para avaliação da fertilidade do solo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

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