

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS – UniEVANGÉLICA
CURSO DE AGRONOMIA**

***Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis* ASSOCIADOS COM
Bradyrhizobium japonicum NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DA
CULTURA DA SOJA**

Rafaela Israel Alcântara

**ANÁPOLIS-GO
2018**

RAFAELA ISRAEL ALCÂNTARA

***Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis* ASSOCIADOS COM
Bradyrhizobium japonicum NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DA
CULTURA DA SOJA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro Universitário de Anápolis-UniEVANGÉLICA, para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Klênia Rodrigues Pacheco de Sá

**ANÁPOLIS-GO
2018**

Alcântara, Rafaela Israel

Trichoderma harzianum e *Bacillus subtilis* associados com *Bradyrhizobium japonicum* na promoção do crescimento da cultura da soja / Rafaela Israel Alcântara. – Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, 2018.

27 páginas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Klênia Rodrigues Pacheco de Sá

Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia – Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, 2018.

1. Coinoculação. 2. Fixação biológica 3. *Glycine max* I. Rafaela Israel Alcântara. II. *Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis* associados com *Bradyrhizobium japonicum* na promoção do crescimento da cultura da soja.

CDU 504

RAFAELA ISRAEL ALCÂNTARA

Trichoderma harzianum E *Bacillus subtilis* ASSOCIADOS COM *Bradyrhizobium japonicum* NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DA CULTURA DA SOJA

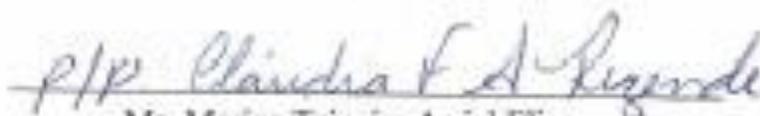
Monografia apresentada ao Centro
Universitário de Anápolis –
UniEVANGÉLICA, para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.
Área de concentração: Microbiologia

Aprovada em:

Banca examinadora



Prof. Dr. Klênia Rodrigues Pacheco de Sá
UniEvangélica
Presidente



Ms. Marina Teixeira Arriel Elias
Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cláudia dos Anjos Mendes
UniEvangélica

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais, meu namorado, aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, e a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Klênia Pacheco.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente tenho que agradecer a Deus por mais essa conquista, pois, sem ele não teria forças para dia após dia.

Também agradeço aos meus pais Marco e Eleusa pelo apoio que me deram durante esses anos. Agradeço ao meu namorado que sempre me ajudou, aos meus amigos que esteve comigo durante todo o curso meu ajudando.

Agradeço também a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Klênia Pacheco, pois, sem ela não conseguiria realizar nem metade desse trabalho.

Obrigada!

“As pessoas costumam dizer que a motivação não dura sempre. Bem, nem o efeito do banho, por isso recomenda-se diariamente.”

Zig Ziglar

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. CULTURA DA SOJA (<i>Glycine max</i>).....	10
2.2. USO <i>Bradyrhizobium japonicum</i> NA SOJA	11
2.3. <i>Trichoderma harzianum</i>	12
2.4. <i>Bacillus subtilis</i>	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) promovida por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tem possibilitado a redução dos custos de produção na cultura da soja, e estudos vem sendo realizados com a utilização de produtos associados com essa bactéria, como o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*. Diante disso, este trabalho objetivou verificar a eficiência da utilização de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* no crescimento da parte aérea e raiz na cultura da soja. O experimento foi conduzido na Unidade Experimental do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis – GO. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, constituído de seis tratamentos com cinco repetições, sendo cada repetição composta por três plantas. Os tratamentos foram compostos por: T1 – Testemunha; T2 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes); T3 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Trichoderma harzianum* (200 ml/100 kg de sementes); T4 – *Trichoderma harzianum* (200ml/100kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200 ml/100 kg de sementes); T5 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200 ml/100 kg de sementes); T6- *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Trichoderma harzianum* (200ml/100kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200ml/100kg de sementes). As variáveis analisadas foram: contagem de plântulas germinadas aos 10 e 12 dias após a semeadura (DAS); altura de planta (cm) e diâmetro do caule (mm) aos 25, 35 e 45 DAS; aos 45 DAS foi realizado a medida do comprimento de raiz, contagem de nódulos por tratamento massa seca de toda a planta (g). A inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* através do tratamento de sementes apresentou resultados superiores na quantidade de nódulos, no comprimento da raiz, altura de planta e diâmetro do caule associado ou não ao *Bacillus subtilis* apresentando os melhores resultados entre os demais tratamentos avaliados. Na maioria das variáveis analisadas com a utilização do *Bradyrhizobium japonicum* se torna a mais viável sendo, portanto, a opção mais adequada para o produtor rural e de menor custo.

Palavras-chave: Coinoculação, Fixação biológica, *Glycine max*.

1. INTRODUÇÃO

A soja que hoje cultivamos é muito diferente dos seus ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China. Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental por milhares de anos, só foi introduzida na Europa no final do século XV (EMBRAPA, 2011).

No contexto mundial e nacional a soja está inserida economicamente como um dos principais produtos agrícolas. No Brasil, ela é a principal cultura em extensão de área e volume de produção. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), na safra 2017/18 a área plantada de soja foi de 35.149,2 mil ha plantados, totalizando uma produção de 119.281,7 mil toneladas. A estimativa para a safra 2018/19 aponta um crescimento entre 0,6% a 2,8% em relação à safra 2017/18 de área plantada podendo chegar a 36.125,1 ha plantados, apesar do aumento de área plantada a produção de soja está estimada em 119.266,7 mil toneladas.

No atual estado de arte, o controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagônicas, surge como ferramentas importantes para o controle biológico aplicado. Particularmente para bactérias, muitos trabalhos vêm sendo realizados para elucidar as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro (ROMEIRO et al., 2005; HALFELD-VIEIRA et al., 2006; RYAN et al., 2008).

Os microrganismos apresentam capacidade de promover o crescimento na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), e um importante componente químico o nitrogênio (N), que pode ser obtido do solo, por meio da decomposição da matéria orgânica, dos fertilizantes nitrogenados, da fixação química de N em descargas elétricas e, ainda, por meio da fixação biológica do N₂, que ocorre pela associação simbiótica com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*.

A fixação biológica de N (FBN) promovida por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tem possibilitado a redução dos custos de produção na cultura da soja, com consequente aumento da competitividade dessa commodity no mercado internacional. Isso tem sido

possível, pois, além de substituir a adubação nitrogenada mineral, a FBN possibilita o aporte de N suficiente para obtenção de alta produtividade de grãos (HUNGRIA et al., 2005).

A implementação de bactérias fixadoras de N, vem sendo utilizada principalmente na inoculação via semente, além das FBN temos também como associação o uso de microrganismos que ajudam no desenvolvimento e resistência da planta a fatores bióticos e abióticos. Vários microrganismos têm sido estudados dentro eles fungos do gênero *Trichoderma sp.* e bactérias do gênero *Bacillus sp.*

O *Trichoderma spp.* apresenta amplitude de ação no antagonismo a fungos e bactérias. Esses microrganismos são atóxicos ao homem e aos animais. Além dos efeitos do *Trichoderma spp.* no controle de patógenos de plantas, certas linhagens podem ter efeito estimulatório no crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (BAKER, 1989). O *Bacillus spp.* promoveram incrementos na nodulação e no rendimento da soja no campo (ARAUJO et al., 2005). Esses microrganismos atuam como indutores de resistência, provocando alterações químicas durante o ataque de patógenos (KLOEPPER et al., 2004).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência da utilização de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* no crescimento da parte aérea e raiz na cultura da soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CULTURA DA SOJA (*Glycine max*)

A soja apresenta como centro de origem a China e foi introduzida no Brasil em 1882, no Estado da Bahia; em 1891, em São Paulo; e, no ano de 1914, no Rio Grande do Sul, sendo considerado o marco inicial da produção comercial ocorrida na década de 1940 (VERNETTI, 1983). É uma importante fonte de divisas para o Brasil, contribuindo com uma parcela significativa das exportações brasileiras. Além disso, inúmeras famílias brasileiras das mais diversas classes econômicas dependem diretamente dos empregos gerados pelo complexo de produção, transporte e industrialização da soja (EMBRAPA, 2007).

A cultura da soja além de ser uma fonte abundante de aproveitamento alimentício geral e diversificado, o grão possui alto valor proteico (até 50% proteína), o que a torna uma das culturas que recebeu mais investimentos historicamente, sendo alvo de grande número de pesquisas visando melhorar sua qualidade e produtividade (DROS, 2004; MARION, 2004). No entanto, o sucesso de todo esse complexo é ainda hoje extremamente dependente das condições climáticas, que sendo melhor entendida de acordo com as exigências da cultura e das relações da água no sistema solo-planta-atmosfera poderá contribuir para a redução dos riscos de insucesso da produção agrícola (EMBRAPA, 2007).

Os altos rendimentos de soja são obtidos quando ocorre um período de 50-55 dias de crescimento vegetativo e acúmulo de 400 a 500 g de matéria seca da parte aérea por m² no florescimento (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Neste período vegetativo formam-se o aparato fotossintético que são as folhas e o número potencial de locais (nós do caule e dos ramos) com gemas onde poderá haver florescimento (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

A fase de estabelecimento das plantas é de fundamental importância para a obtenção de elevados rendimentos de grãos, pois determinará o número de plantas por área e a formação do dossel compostos pelas folhas e as diversas ramificações dos caules (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). A maturação fisiológica do grão ocorre quando cessa o acúmulo de matéria seca, e nesse estágio o grão perde a coloração verde, apresenta em torno de 60% de umidade, sendo que a maturação ideal para a colheita ocorre quando os grãos apresentam menos de 15% de umidade (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

A soja possui cultivares com dois hábitos de crescimento, o crescimento determinado e o indeterminado, que é baseado de acordo com características do ápice do caule principal (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Os cultivares de hábito de crescimento determinado tem

as plantas com caules terminados por racemos florais, após o início do florescimento, onde as plantas aumentam pouco a altura (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

Para o bom desenvolvimento da cultura da soja em uma determinada região é necessário, entre outras coisas, condições climáticas como a precipitação, temperatura e fotoperíodo favoráveis (GIANLUPPI et al., 2009). A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta e atua praticamente em todos os processos fisiológicos e bioquímicos, sendo de grande importância principalmente em dois períodos de desenvolvimento da soja: a fase de germinação/emergência e floração/enchimento de grãos (EMBRAPA, 2011; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007)

As condições ótimas de temperatura para a cultura da soja estão entre 20°C e 30°C, sendo a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento está em torno de 30° C (GIANLUPPI et al., 2009; EMBRAPA, 2011; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007). O crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo em temperaturas menores ou iguais a 10°C. Acima de 40°C ocorre efeito adverso na taxa de crescimento provocando danos na floração e diminuindo a capacidade de retenção de vagens (GIANLUPPI et al., 2009; EMBRAPA, 2011; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

A floração da soja somente é induzida com temperaturas acima de 13°C, sendo importante ressaltar que as diferenças da data de floração, entre cultivos, apresentadas por uma mesma cultivar semeada na mesma época e latitude, são devido às variações de temperatura que pode ser agravado caso haja insuficiência hídrica e/ou fotoperiódica durante a fase de crescimento (GIANLUPPI et al., 2009; EMBRAPA, 2011). A maturação pode ser acelerada pela ocorrência de altas temperaturas e, quando associadas a períodos de alta umidade contribuem para diminuir a qualidade das sementes (GIANLUPPI et al., 2009). E quando exposta as baixas temperaturas associadas a períodos chuvosos ou de alta umidade, a maturação pode atrasar e ainda causar haste verde e retenção foliar (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

2.2. USO *Bradyrhizobium japonicum* NA SOJA

Os estudos com FBN em leguminosas iniciaram nos anos de 1950, desde então, a utilização de inoculantes com rizóbios gerou para a cultura da soja uma economia em fertilizantes nitrogenados de aproximadamente U\$ 3 bilhões/ano. Avanços no melhoramento genético da planta de soja e nas pesquisas em microbiologia do solo tornaram possíveis

substituir a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes com estirpes de rizóbio (*Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*). Isso proporcionou o suprimento de quase todo nitrogênio demandado pela cultura (BELTRAME, 2010).

A soja requer grandes quantidades de N devido ao seu elevado teor de proteína e, na ausência da simbiose com *Bradyrhizobium*, chegaria a ser uma cultura inviável diante dos custos elevados que o agricultor teria com fertilizantes (VARGAS; HUNGRIA, 1997). A utilização de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio (N₂) (*Bradyrhizobium* sp.) aplicados junto às sementes de soja, é prática rotineira na condução da cultura. Essa operação tem apresentado resultados altamente positivos agronomicamente, principalmente em solos onde a cultura nunca foi conduzida, ou em solos com poucos anos de cultivo de soja, pois, a partir de um certo período com cultivo de sementes de soja inoculadas, os rizóbio já começam a estar presentes no solo (indígenas) (THURLOW; HILBOLD, 1985; MARENCO et al., 1993).

Além disso, alterações hormonais nas plantas submetidas à hipóxia, como o aumento da produção endógena de etileno, também podem prejudicar a nodulação (JAMES; CRAWFORD, 1998; OLDROYD et al., 2001). A inibição da nodulação por etileno, contudo, pode ser compensada pela produção de rizobiotoxina por *Bradyrhizobium elkanii* (DUODU et al., 1999). Tal mecanismo de limitação da produção de etileno não é conhecido em outras espécies de rizóbio. Assim, plantas de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* poderiam ter sua nodulação mais afetada pela inundação do solo do que as inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*.

O sucesso da cultura da soja, do ponto de vista econômico, depende da eficiência do processo de fixação biológica do N₂. Além do incremento de produtividade, outras vantagens têm surgido para facilitar e alavancar a técnica da inoculação da soja com *Bradyrhizobium spp.* na cultura da soja e feijão, como a forma de inocular em sulco de semeadura. Esta surgiu como uma estratégia e tornou capaz a compatibilidade do processo de inoculação associado ao tratamento de sementes com fungicidas, inseticidas e nematicidas (HUNGRIA et al., 2007).

Avaliações conduzidas em várias regiões produtoras de soja mostram que a FBN é responsável por mais de 80% do N acumulado pela planta. Isso demonstra que a exploração do processo de FBN garantiu o sucesso da soja, no Brasil, e tornou competitiva mundialmente (ZILLI et al., 2013).

2.3. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma spp. são fungos de solo que estão entre os agentes de controle biológico mais estudados e comercialmente vendidos como biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes de solo (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004). As espécies desse gênero representam um grande componente da diversidade de vida na Terra (SAMUELS, 2006).

Para a agricultura, além do controle de patógenos, o uso de *Trichoderma spp.* pode oferecer várias vantagens como: decomposição de matéria orgânica, uma microflora competitiva/deletéria através da colonização da rizosfera e melhoria da saúde e crescimento das plantas (HOWELL et al., 2000; HARMAN et al., 2004; HOITINK et al., 2006). Muitos estudos mostram a ação supressora de *Trichoderma spp.* e do composto. Contudo, poucos correlacionam a ação supressora do composto à presença de *Trichoderma spp.* no meio (HOITINK; KUTER, 1986; CHUNG; HOITINK, 1990).

Esses fungos também colonizam madeira, onde a fase sexual teleomorfa (gênero *Hypocrea*) é frequentemente encontrada. Muitas linhagens não possuem ciclo sexual conhecido (HARMAN et al., 2004), sendo classificadas na subdivisão Deuteromycotina. Os deuteromicetos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER; BACCHI, 1995).

Um dos mecanismos do *Trichoderma sp.* é a promoção de crescimento vegetal, em ausência de fitopatógenos, ainda são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o controle biológico (POMELLA; RIBEIRO, 2009). A ação de *Trichoderma* como estimulador do crescimento é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos (BAUGH; ESCOBAR, 2007).

Os organismos competem entre si para obter nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros (MELO, 1996). A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004). Esse é considerado um dos clássicos mecanismos de biocontrole (HARMAN, 2000).

Segundo HARMAN (2000), dentre as substâncias que podem ser sintetizadas, muitas espécies de *Trichoderma sp.* já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. Esses metabólitos podem ser voláteis e não-voláteis. Cerca de 40 substâncias produzidas por *Trichoderma* possuem atividade antibiótica, não incluindo as enzimas. O referido autor

considera a inativação de enzimas de patógenos outro mecanismo de biocontrole de trichoderma.

Um dos mecanismos do *Trichoderma sp.* inicialmente relacionada ao controle dos microrganismos prejudiciais presentes no solo foi a promoção de crescimento de plantas promovida pela aplicação do fungo. Entretanto, na ausência de fitopatógenos, segundo LUCON (2009), tal mecanismo de ação tem sido relacionado à produção de hormônios ou fatores de crescimento, maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta.

2.4. *Bacillus subtilis*

A estrutura do *Bacillus subtilis* é em forma de um bastonete de aproximadamente 3-5µm de comprimento e 1µm de largura. Durante o crescimento vegetativo, a bactéria se alonga e ao atingir o dobro do tamanho inicial um septo é formado na posição mediana, dividindo-se em duas células de mesmo tamanho (divisão simétrica). Os dois cromossomos gerados, após a duplicação do DNA, ficam separados pelo septo localizado na posição mediana da célula (BONATO, 2000).

O interesse pela utilização de *Bacillus subtilis*, na promoção de crescimento e como agente de biocontrole, começou nos anos 50, quando foi observado maior crescimento de plantas em cujas rizosferas foram aplicadas linhagens desse gênero. Posteriormente, demonstrou-se que esses microrganismos também podem ser utilizados na superfície de folhas para controle biológico (BACKMAN et al., 1997).

A promoção de crescimento ocasionada por *Bacillus subtilis* é consequência do aumento da fixação de N, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microrganismos maléficos (MANJULA; PODILE, 2005).

Adicionalmente, a associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular as condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes. Isolados de *Bacillus subtilis* também tem a capacidade de conduzir a regulação hormonal de plantas, governando assim, o controle do crescimento radicular pela síntese de auxina, giberelina e citocininas (TSAVKELOVA et al., 2006).

Como agentes de biocontrole o *Bacillus subtilis*, apresenta atividade biológica contra bactérias e fungos fitopatogênicos. O seu potencial como biocontrolador é alto por apresentar como características estar presente nos solos, tolerar altas temperaturas, rápido crescimento em culturas líquidas, formação de esporos resistentes, e serem considerados agentes de proteção biológica seguros (SHODA, 2000).

Devido à promoção de crescimento proporcionada pelo *Bacillus subtilis* é encontrada uma rápida germinação das sementes. Isso foi constatado em estudos realizados por (MANJULA; PODILE, citado por LANNA FILHO et al., 2010), estes trataram sementes de feijão guandu com formulação a base de *Bacillus subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina. Assim verificaram que houve um aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%.

Desta maneira, o rápido desenvolvimento da plântula condiciona a mesma a alcançar mais rapidamente o estágio adulto, permanecendo menos tempo no campo, o que favorece o escape contra patógenos presentes no solo e no ambiente externo. Além disso, promove maior resistência a condições abióticas adversas por apresentar-se nutricionalmente balanceadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unidade Experimental do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis – GO, tendo as coordenadas 16°19'36"S e 48°27'10"W, com altitude 1.017 metros. O clima da região é classificado de acordo com Köppen como Aw (tropical com estação seca) com temperatura mínima de 18 °C e máxima de 32 °C, chuvas de outubro a abril e precipitação pluviométrica média anual de 1.450 mm e temperatura média anual de 22 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, constituído de seis tratamentos com cinco repetições, sendo cada repetição composta por três plantas. O experimento foi conduzido em vasos de 10kg contendo solo coletado da área experimental, onde foram misturados para homogeneização para não haver diferenças entre os tratamentos. Na adubação de base foram utilizados 400 kg de adubo da fórmula 04-14-08. Foram plantadas dez sementes em cada vaso da cultivar e realizado os desbastes 10 dias após a germinação deixando as três plantas mais vigorosas por vaso.

- A variedade de soja utilizada foi a 8473 Empresa AgroRosso.



FIGURA 1 – Disposição do experimento da cultura da soja com o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da UniEVANGÉLICA, 2018.

Fonte: Autora.

Os tratamentos foram compostos por: T1 – Testemunha; T2 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes); T3 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Trichoderma harzianum* (200 ml/100 kg de sementes); T4 – *Trichoderma harzianum* (200ml/100kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200 ml/100 kg de sementes); T5 – *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200 ml/100 kg de sementes); T6- *Bradyrhizobium japonicum* (60g/50kg de sementes) + *Trichoderma harzianum* (200ml/100kg de sementes) + *Bacillus subtilis* (200ml/100kg de sementes).

As variáveis analisadas foram: altura de planta (cm) por meio de paquímetro, determinada a partir da medida entre o substrato até a inserção do primeiro trifólio, aos 25, 35 e 45 DAS; diâmetro do caule (mm) medido com paquímetro aos 25, 35 e 45 DAS; aos 45 DAS também foi realizado a medida do comprimento de raiz e a contagem de nódulos por tratamento.

Os dados das avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias foram submetidas para comparação ao teste Duncan ($P \leq 0,05$) utilizando o programa Assistat 7.7. beta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável altura de plantas apresentado na Tabela 1, a avaliação realizada aos 25 e 35 DAS o tratamento T5 utilizando o *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, obteve os melhores resultados diante dos demais tratamentos avaliados. Aos 45 DAS os tratamentos T4 e T5 não diferiram entre si, apresentando diferença significativa ao T6. Sotelo et al. (2010) avaliando a nodulação de plantas de soja verificaram que essas são afetadas pela inoculação do cultivo anterior, todavia não observaram efeito da inoculação sobre a altura de planta quando estas foram inoculadas ou não.

TABELA 1 – Altura de plantas aos 25, 35 e 45 DAS avaliados na cultura da soja com o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da UniEVANGÉLICA, 2018.

Tratamentos	25 DAS	35 DAS	45 DAS
Testemunha	40,03 b ¹	47,13 ab ¹	55,73 ab ¹
<i>B. japonicum</i>	40,26 b	46,40 b	55,20 ab
<i>B. japonicum</i> + <i>T. harzianum</i>	36,16 b	43,53 b	53,73 ab
<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	41,63 ab	50,30 ab	59,20 a
<i>B. japonicum</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	47,36 a	53,66 a	58,86 a
<i>B. japonicum</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	42,46 ab	44,94 b	52,66 b
CV%	20,65	18,04	12,17

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variância.

Rodrigues et al. (2012) avaliando à altura de plantas de soja, em sua primeira avaliação aos 15 DAS, o tratamento que melhor se destacou apresentando valor médio de 24,17 cm foi com o *Bradyrhizobium sp.* (BR 3267) + V 22.32 (*Paenibacillus durus*). Nas avaliações seguintes aos 25 e 35 DAS os mesmos autores encontraram melhores resultados no tratamento BR 3267 + C 04.50 (*Paenibacillus durus*), com valores médios de 48 e 120 cm, respectivamente.

Para as análises do diâmetro de caule apresentado na Tabela 2, aos 25 DAS o tratamento que obteve o melhor resultado foi o T2 com a utilização do *Bradyrhizobium japonicum*. Aos 35 DAS o tratamento T5 observou maior diâmetro do caule, diferindo estatisticamente dos demais. E, aos 45 DAS os tratamentos T2 e T3 não diferiram da testemunha. Este fato pode ser explicado que mesmo não havendo inoculação na testemunha, as bactérias existentes no solo ainda assim foram competitivas (SANTOS et al., 2012).

TABELA 2 – Diâmetro do caule aos 25, 35 e 45 DAS, avaliados na cultura da soja com o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da UniEVANGÉLICA, 2018.

Tratamento	25 DAS	35 DAS	45 DAS
Testemunha	2,57 ab ¹	2,80 ab ¹	2,86 a ¹
<i>B. japonicum</i>	2,61 a	2,84 ab	2,83 a
<i>B. japonicum</i> + <i>T. harzianum</i>	2,20 c	2,68 ab	2,49 b
<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	2,43 ab	2,79 ab	2,80 a
<i>B. japonicum</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	2,55 ab	2,90 a	2,76 ab
<i>B. japonicum</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	2,36 bc	2,57 b	2,60 ab
CV%	10,87	12,84	13,15

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variância.

Pereira et al. (2016) avaliando diferentes doses do uso do *Bradyrhizobium japonicum* em três cultivares de soja, observou que o diâmetro do caule apresentou diferença significativa entre as cultivares, podendo relacionar que essa diferença pode ser mais acentuada em determinadas cultivares. Correia (2015) avaliando o diâmetro do caule verificou que a soja sem inoculação obteve 7,42 mm na área A e 6,12 mm na área B. Para inoculação via semente e via sulco, a média do diâmetro do caule foi de 7,36 mm na área A e 5,86 mm na área B, valores 0,8 e 4,2% menores, respectivamente, que sem inoculação.

Em relação aos resultados da quantidade de nódulos obtidos aos 45 DAS (Figura 2), observou-se que o tratamento T2 que foi inoculado apenas com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, obteve maior quantidade de nódulos radiculares. Esses dados corroboram com os de Butrinowski et al. (2015) que avaliaram a inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* na proporção de 60 ml para cada 50 Kg de sementes na forma líquida, verificando-se que esse tratamento foi o que apresentou o maior número de nódulos e podendo ocorrer uma competição em os microrganismos.

Vieira Neto et al. (2008), ao realizarem trabalho sobre formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja, concluíram que após vários anos de cultivo com soja, a melhor resposta à nodulação ocorre com aplicação de inoculante líquido no sulco de semeadura, sendo registrados até 50 nódulos por planta. Zilli et al. (2010), comparando inoculação via sulco com via semente, encontraram aumento de 61% no número de nódulos por planta, de 14 para 37, em área de dois anos de inoculação. Além da inoculação via sulco a reinoculação, prática anual de inoculação de solos já cultivados com soja e colonizados por

Bradyrhizobium, também contribuiu para a maior nodulação das raízes da soja. Câmara (2014) indica esta prática para auxiliar a manter no solo um nível satisfatório de população bacteriana, justificando o maior número de nódulos por planta na inoculação via semente e via sulco, em relação à sem inoculação.

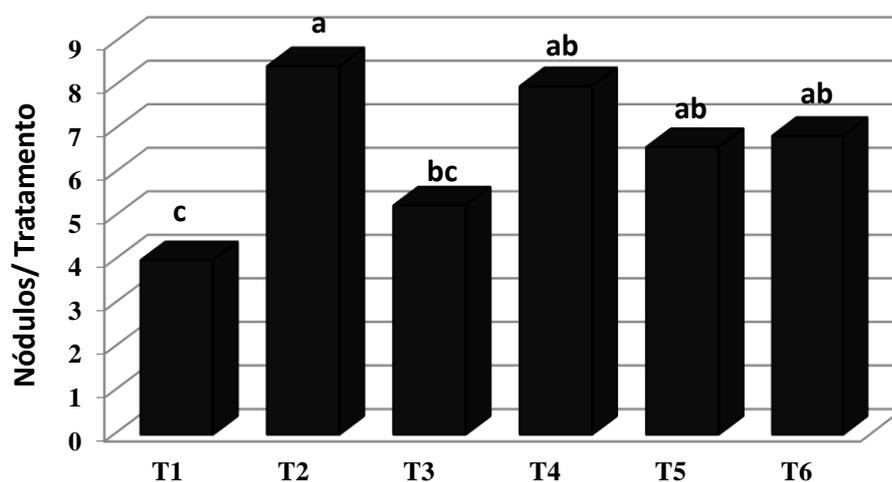


FIGURA 2 – Quantidade de nódulos avaliados na cultura da soja com o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da UniEVANGÉLICA, 2018. **T1**- Testemunha; **T2**- *B. japonicum*; **T3**- *B. japonicum* + *T. harzianum*; **T4**- *T. harzianum* + *B. subtilis*; **T5**- *B. japonicum* + *Bacillus subtilis*; **T6**- *B. japonicum* + *T. harzianum* + *B. subtilis*.

Os resultados obtidos do comprimento de raiz (Figura 3), o tratamento T5 no qual foi inoculado *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus subtilis*, se destacou diante dos demais tratamentos. Os tratamentos T2, T3, T4 e T6 não diferiram estatisticamente entre si, mas comparado a testemunha obteve-se melhores resultados. Segundo Braccini et al. (2016) acredita-se que combinações de bactérias aplicadas possam proporcionar incremento nas características agrônômicas da soja, resultando em uma maior fixação de nitrogênio proporcionada pela atuação desses microrganismos.

Molla et al. (2001) em condições laboratoriais analisaram o potencial de melhoria de crescimento das raízes e nodulação em soja coinoculadas, sendo verificado que a bactéria *Azospirillum* estimula significativamente o crescimento radicular até mesmo em plantas com raízes cortadas, o que implica em influência positiva sobre o crescimento e desenvolvimento radicular. O maior comprimento de raiz foi observado por Vessey; Buss, 2002, no tratamento

absoluto em que apresentou valor de 18,4 cm e o menor valor foi encontrado com o tratamento BR 3267+ LMD 24.16 (*P. polymyxa*), apresentando 12,53 cm. Os demais tratamentos apresentaram valores de comprimento de raiz intermediários ($\approx 92\%$) não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos avaliados, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O maior desenvolvimento radicular pode contribuir indiretamente para nodulação e fixação de nitrogênio.

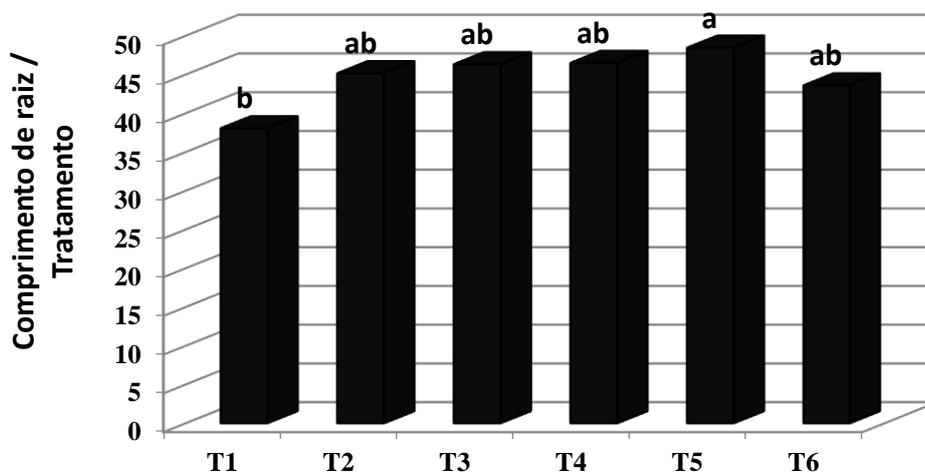


FIGURA 3 – Comprimento da raiz (cm) avaliados na cultura da soja com o uso de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da UniEVANGÉLICA, 2018. **T1**- Testemunha; **T2**- *B. japonicum*; **T3**- *B. japonicum* + *T. harzianum*; **T4**- *T. harzianum* + *B. subtilis*; **T5**- *B. japonicum* + *Bacillus subtilis*; **T6**- *B. japonicum* + *T. harzianum* + *B. subtilis*.

A inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio, além de disponibilizarem maior número de células de *Bradyrhizobium japonicum* com maiores doses do inoculante, também podem reduzir o risco do tratamento de sementes inutilizar todas as bactérias inoculadas e outros microrganismos, pois estudos têm mostrado que o tratamento com fungicidas imediatamente antes da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* – como é normalmente recomendado – pode acarretar na redução da nodulação superior a 80% e da

produtividade de grãos superior a 20%, dependendo do ingrediente ativo do produto, da textura do solo e do histórico de cultivo das áreas (ZILLI et al., 2010).

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 (BRACCINI et al., 2016).

A contribuição da fixação biológica para a cultura da soja no Mercosul é um exemplo de sucesso reconhecido internacionalmente e que deve ser creditado, principalmente, à perseverança de pesquisadores e difusores de tecnologia em procurar alternativas ecologicamente corretas e de baixo custo para o agricultor. Existem, ainda, ganhos ambientais, pela menor poluição de lagos, rios e lençóis freáticos pelo nitrato, evitando futuros investimentos na despoluição ambiental, bem como a menor emissão de gases de efeito estufa. Essas vantagens não podem ser perdidas, exigindo mais do que nunca esforços para não ceder às pressões internas e externas pela troca dos ganhos da fixação biológica do N₂ pela momentânea facilidade de ganhos pela aplicação de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA, 2011).

5. CONCLUSÃO

A inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* através do tratamento de sementes apresentou resultados superiores na quantidade de nódulos, no comprimento da raiz, altura de planta e diâmetro do caule associado ou não ao *Bacillus subtilis* apresentando os melhores resultados entre os demais tratamentos avaliados.

Na maioria das variáveis analisadas com a utilização do *Bradyrhizobium japonicum* se torna a mais viável sendo, portanto, a opção mais adequada para o produtor rural e de menor custo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja coinfectedada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. elkanii. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643, 1999.
- ARAUJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**. v.32, p.456-462, 2008.
- BACANAMWO, M. & PURCELL, L. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. **J. Exp. Bot.**, 50:689-696, 1999a.
- BLACK, R. J. **Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva**. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, p.1-18, 2000.
- BONETTI, L. P. **Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição**. In :MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas: ITAL, p. 1-6,1981.
- BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; DA SILVA LIMA, L. H.; PICCININ, G. G. 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. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.
- BUTRINOWSKI, R. T.; BUTRINOWSKI, I. T.; DOS SANTOS, E. L.; SANTOS, R. F. Adubação nitrogenada e a fixação biológica através do inoculante *Bradyrhizobium japonicum* no desenvolvimento vegetativo da soja. **Acta Iguazu**, v. 4, n. 3, p. 1-9. 2015.
- CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 147, p. 1-9, 2014.
- CHUNG, Y. R.; HOITINK, H. A. J. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia damping-off* in a bark compost-amended container medium. **Phytopathology**, 1990. v. 80, p. 73-77.
- CONAB, 2018. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 6 Safra 2018/19 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-142, novembro 2018.
- CORREIA, T. P. da S. **Eficiência operacional, econômica e agrônoma da inoculação de soja via sulco de semeadura**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Energia na Agricultura). 2015.
- DROS, J. M. **Administrando os avanços da soja**: dois cenários de expansão do cultivo de soja na América do Sul. Amsterdã: AIDEnvironment, 2004. 71p.
- DUODU, S.; BHUVANESWARI, T.V.; STOKKERMANS, T.J.W. & PETERS, N.K. A positive role for rhizobitoxine in rhizobium-legume symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, 12:1082-1089, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Soja**. 2011
Acessado em: 20/12/2011. Disponível em: www.embrapa.gov.br.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil 2012 e 2013**.
Sistemas de Produção, n. 15. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2003**. Sistema de
Produção, n. 1. Londrina: Embrapa Soja, 2003.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil 2004**. Sistemas
de Produção, n. 1. Londrina: Embrapa Soja.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. Ames: State University of
Science and Technology, 1977. 11 p. (Special report, 80).

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina:
Embrapa Soja, 2007. (Circular técnica, n. 48).

GIANLUPPI, V. et al. **Cultivo de soja no cerrado de Roraima**. Sistema de Produção, Boa
Vista: Embrapa Roraima, 2009.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from
research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 2000. v.84, p.377-392. HARMAN,
G. E. et al. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews
Microbiology**, 2004.

HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na perspectiva do Mercosul: novos
conhecimentos e tecnologias disponíveis. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso
(ALICE)**. In: CONGRESO DE LA SOJA DEL MERCOSUR, 5.; FORO DE LA SOJA
ASIA, 1., 2011.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea
in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal
of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARENCO, R.A., LOPES, N.F., MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in
soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.121-126,
1993.

MOLLA, A. H.; SHAMSUDDIN, Z. H.; HALIMI, M. S.; MORZIAH, M., PUTEH, A. B.
Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with
Azospirillum and I in laboratory systems. **Soil Biology & Biochemistry, Elmsford** , v. 33, n.
4, p. 457-463, 2001.

NAKANO, M. M.; AND ZUBER, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe”. (*Bacillus
subtilis*). **Annual Review of Microbiology**, 52, p. 165-190. 1998.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B. **Estádios de desenvolvimento da cultura de soja**. In: BONATO, E.R. (Ed.). Estresses em soja. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 2000a. p. 19-44.

PEREIRA, C. S.; BUOSI, I. B.; ZONTA, L. H.; LANGE, A.; FIRORINI, I. V. Doses de inoculante *Bradyrhizobium japonicum* em três cultivares de soja no norte de mato grosso. **Global science and technology**, v. 9, n. 1, 2016.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; DE MEDEIROS, V. V.; DE FRANÇA BARROS, B. G.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

SAMUELS, G. J. Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, 2006. v. 96, p. 195-206.

SANTOS, V.A.F.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efficiency of soybean nodules related to rhizobia hydrogenase is influenced by light level. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p.15-21, 1996.

SANTOS, E. L. dos; CATTELAN, A.J.; PRETE, C.E.C.; NEUMAIER, N.; OLIVEIRA, M.C.N. de; FARIAS, J.R.B.; CARVALHO, J.F.C.; NEPOMUCENO, A.L. Water stress affecting nodulation, oil, protein and grain yield of soybean cultivars. **Global Science and Tecnology**. Rio Verde, v. 5, n. 2, p. 109 - 120, 2012.

SILVA, L. L.; PINTO, L. S. R. C. Resposta da soja utilizando diferentes condições de inoculação com *Bradyrhizobium*. **Anais do Seminário de Pesquisa e Inovação Tecnológica-SEPIT**, v. 1, n. 1, 2017.

SOTELO, C. E.; LCONTE, M. C.; IGLESIAS, M. C. Efecto de la inoculación al cultivo antecesor sobre la nodulación de la soja, en suelos de desmonte. **Agrotecnia, Corrientes-Ar**, v. 20, n. 1, p. 13-17. 2010.

NETO, S. A. V.; PIRES, F. R.; MENEZES, C. C. E.; SILVA, A. G.; DE ASSIS, R. L.; SILVA, G. P.; MENEZES, J. F. S. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos na cultura da soja. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, 2008.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 295-360.

VESSEY, K.; BUSS, T. J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes – Controlled-environment studies. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 82, p. 282–290, 2002.

YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 75p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular técnica, 14).

ZILLI, J. É.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, J. R. C.; & HUNGRIA, M.
Inoculação da soja com Bradyrhizobium no sulco de semeadura alternativamente à inoculação
de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, 2010.