

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE GOIÁS UNI-GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO PRESENCIAL – PROEP
SUPERVISÃO DA ÁREA DE PESQUISA CIENTÍFICA - SAPC
CURSO DE AGRONOMIA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES BENÉFICAS EM NÓDULOS DE SOJA

KAROLLYNE SIQUEIRA SILVA
ORIENTADOR: Dr. RENATO CARRER FILHO

GOIÂNIA
Junho/2021

KAROLLYNE SIQUEIRA SILVA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓTCONES BENÉFICAS EM NÓDULOS DE SOJA

Trabalho final de curso apresentado e julgado como requisito para obtenção do grau de bacharelado no curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás UNI-GOIÁS na data de 24 de Maio de 2021.



Prof. Dr. Renato Carrer Filho
UNI-GOIÁS / Orientador



Prof. Dra. Sara Lane Sousa Gonçalves
UNI-GOIÁS / Examinadora



Prof. Dra. Luciana Domingues Bittencourt Ferreira
UNI-GOIÁS / Examinador

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu força e sabedoria para concluir esse projeto; à minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos, sem eles nada seria possível e aos meus amigos de curso que me apoiaram e ajudaram durante essa jornada.

Agradeço ao meu orientador Renato Carrer Filho, que aceitou me acompanhar nesse projeto e disponibilizou o seu laboratório para a realização do presente estudo.

Quando se rega um sonho com fé, Deus abençoa a colheita (Inês Seibert).

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES BENÉFICAS EM NÓDULOS DE SOJA

Karollyne Siqueira Silva¹

Renato Carrer Filho²

Resumo: A soja é uma das principais leguminosas de importância agrícola, que cresce a cada dia e gira a economia. A cada safra existe uma necessidade maior de produção mais sustentável e tecnológica, visando a diminuição de insumos, ganhos de produtividade e menores impactos ambientais. Esta leguminosa necessita de uma grande demanda de nitrogênio (N), nesse contexto, as bactérias nodulantes surge com seus benefícios promovendo a fixação biológica de nitrogênio e o desenvolvimento de plantas. O objetivo desse trabalho foi selecionar bactérias promotoras de crescimento autóctones associativas a nódulos. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Centro Universitário de Goiás - Uni-Goiás e no Laboratório de Clínica e Análise de Sementes e Diagnóstico de Plantas Agro Conecta, em Goiânia. Em campo foram feitas coletas de diferentes tipos de solos de variados sistemas de plantio para isolamento, seleção e avaliação das bactérias. O isolamento de bactérias em nódulos de soja foi realizado pelo método de estrias e, após 14 dias teve-se uma coleção de 17 possíveis bactérias associativas. Estas foram inoculadas em sementes de soja e depois semeadas. O ensaio foi realizado por delineamento inteiramente casualizado, em um total de 18 tratamentos, 4 repetições e 2 sementes em cada vaso. As variáveis obtidas através da inoculação após 30 dias de semeadura foram, nódulos de raízes, massa seca da raiz e massa seca da parte aérea. As bactérias isoladas de nódulos de soja UNG – (B15, B9, 05, A10, 02, 03, 13 e 180) foram capazes de promover incremento no sistema radicular que variou de 31,3 a 69,5% da massa seca da raiz.

Palavras-chave: Nitrogênio. Solo. FBN. Raiz. Promotora de crescimento.

¹Discente do curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni-GOIÁS. E-mail: karollyne1998@hotmail.com.

²Professor do Centro Universitário de Goiás – Uni-GOIÁS. Dr. em Fitopatologia. E-mail: carrerfilho@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycinemax*) é de grande importância para o cenário mundial, seu valor econômico é a principal atividade no agronegócio brasileiro. Tanto para a produção de sementes, quanto para grãos, seu produto final tem várias destinações para a agroindústria, como produção de óleo vegetal, rações, indústria química e de alimento e até fonte de biocombustível, o que corresponde o maior percentual de crescimento de produtividade nos últimos anos (GAZZONI; DALL' AGNOL, 2018).

A planta de soja tem característica herbácea, com sistema radicular pivotante, pertence a classe Magnoliopsida (Dicotiledônea). Ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae e gênero *Glycine*, espécie *Glycinemax*. Graças as variabilidades genéticas, pode-se ter cultivares de crescimento determinado ou indeterminado (GUIMARÃES, 2018 apud BALBINOT JUNIOR *et al.*, 2018). A soja de hoje comparada a da antiguidade tem aspectos botânicos e de produtividade totalmente distintos (EMPRABA, 2013).

A sua origem veio da região de Manchúria, localizada no nordeste da China. Na Europa chegou em meados do século XVII, mas foi cultivada apenas por curiosidade botânica, ficando associadas à jardins botânicos. A primeira referência sobre a cultura no Brasil foi em 1882, na Bahia, sendo que a cultivar trazida dos Estados Unidos (USA) não se adaptou muito bem. Oficialmente, no Brasil foi implantada em 1914 em Santa Rosa – RS, mas sua grande expansão só ocorreu a partir de 1970 (MANDARINO, 2017).

No Brasil, tem estabelecido um importante processo de desenvolvimento econômico e social, podendo expandir sua área cultivada, assim suprir a demanda maior pelo grão. Uma das principais demandas está ao aumento de carne, vinculada com a aquisição de ração. A soja tem uma proteína vegetal que ao ser ingerida tanto por ser humano ou animal se torna proteína animal. Em uma ração cerca de 70% de seu componente é soja (DALL' AGNOL, 2016).

Segundo Gazzoni (2018) a soja necessita de uma grande demanda de nutrientes, em especial o nitrogênio (N). Alguns produtores preferem utilizar a forma de fertilizante químico para suprir a demanda de N, o que acarreta maior custo econômico e menos eficiente quando comparado a técnica de fixação biológica de nitrogênio (FBN). A aplicação desses fertilizantes químicos além de reduzir na nodulação das raízes e diminuir a eficiência da FBN, não traz aumento na produtividade comparada com uma soja inoculada com bactérias (PRANDO *et al.*, 2019). Assim, existe a possibilidade de todo N exigido pela cultura, poder ser fornecido no solo através de bactérias que fazem o processo de FBN. Processo em que se a uma associação simbióticas das raízes da soja com bactérias diazotróficas nodulantes, formando nódulos nas raízes,

transformando todo o nitrogênio atmosférico (N₂) em N assimilável, suprimindo assim toda a necessidade da planta e dispensando o uso de fertilizantes químicos (PRANDO *et al.*, 2019).

A exploração da fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja aumenta a cada dia, com impactos positivos na disponibilização no nitrogênio e crescimento radicular, fornecendo melhores condições para a absorção de água e nutrientes, proporcionando ótimo desempenho na planta, diminuindo gasto com fertilizantes nitrogenados e com consequentes ganhos na lavoura (ANTUNES, 2019).

Estima-se que só no Brasil, com o uso da FBN na soja, já proporcionou uma economia gigantesca de mais de 3 bilhões de dólares anual (ZELLI, MARSON, 2018).

A bactéria que tem no mercado com maior nível de eficiência é a espécie *Bradyrhizobium japonicum*, adicionadas nas sementes ou no sulco de plantio. Essas bactérias começam a operar depois de 15 dias após a germinação da plântula de soja. O uso desta tecnologia pode acarretar uma economia de cerca de R\$ 15 bilhões por ano de adubos sintéticos nitrogenados, juntamente com os custos operacionais na aplicação da semeadura ou em cobertura (DALL'AGNOL, 2016).

Levando em consideração que a soja é uma das principais leguminosas e de extrema importância no agronegócio, o presente trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos autóctones benéficos presentes no solo, associativas a nódulos de soja e promotoras de crescimento em plantas.

2 MÉTODO

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Centro Universitário de Goiás - Uni-Goiás e no Laboratório de Clínica e Análise de Sementes e Diagnose de Plantas - Agro Conecta, situados ambos em Goiânia - GO. O clima da região é tropical, no verão há mais pluviosidade que no inverno, de acordo com a classificação de Köppen e Geiger o clima é classificado como Aw, a temperatura média é de 23.1°C, o valor da pluviosidade média anual é de 1414 mm.

O ensaio teve início com a coleta de diferentes tipos de solos de variados sistemas de plantio para isolamento, seleção e avaliação de bactérias autóctone associativas a cultura da soja. Assim, cerca de 5,0 L de solo foram coletados em campos de forrageiras e campo cultivado com soja comercial, ambas no município de Cezarina/GO, e solo de vegetação nativa situada no município de São Miguel do Passa Quatro/GO. Os solos foram coletados e separados em camadas de 0-20 cm e de 20-40 cm de profundidade e colocados em potes de 4,0 L para posterior semeio de soja.

As sementes de soja, cv Bonus, foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão a 30 segundos em álcool 70,0 %, seguido de 30 segundo em hipoclorito de sódio a 10,0 % e por último 2 vezes em água estéril por 1 minuto. Assim, depois desse processo as sementes foram semeadas em potes contendo os diferentes tipos de solo coletado em diferentes camadas. Neste, um total de 6 vasos mantidos em casa de vegetação, com 3 sementes de soja em cada.

Decorridos 45 dias pós semeio, as plantas foram encaminhadas para o laboratório, as raízes lavadas em água corrente e procederam-se coleta e separação dos nódulos. Estes, passaram pelo processo de desinfestação superficial, como foi descrito acima e, em seguida, foram macerados e, com auxílio de Alça de Drigalk, procedeu isolamento pelo método de estrias (ROMEIRO, 2007). O isolamento foi feito em placas de Petri autoclavadas contendo meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970). As placas foram colocadas em B.O.D. em temperatura de 28°C durante 14 dias no laboratório.

Depois dos 14 dias, colônias de bactérias que cresceram isoladas, foram repicadas em novas placas de Petri contendo meio de cultura, formando assim, a coleção de possíveis rizobactérias. Com a posse da coleção de 17 possíveis bactérias associativas, sementes de soja foram devidamente desinfestadas superficialmente, tratadas com cada bactéria e semeadas em vasos contendo substrato da Bioflora®, em casa de vegetação. Para a microbiolização de sementes foi utilizado método de imersão de sementes em suspensão por 30 minutos, de cada bactéria (Carrer Filho *et al.*, 2015). A concentração de células foi ajustada em câmara de Neubauer para 10^9 UFC.mL⁻¹.

O ensaio foi realizado por delineamento inteiramente casualizado, com testemunha, sem presença de qualquer bactéria e as 17 rizobactérias isoladas, totalizando 18

tratamentos com 4 repetições. Cada parcela de repetição foi constituído por 2 sementes em cada vaso.

Depois do semeio, foram feitas visitas semanais, para acompanhar o desenvolvimento da soja e verificar se a irrigação também estava de acordo. Para avaliação de promoção de crescimento por bactérias associativas, após 30 dias foram retiradas as plantas dos vasos, retirando o substrato e lavando as raízes com cuidado. Em seguida as raízes e a parte aérea foram colocadas separadamente em saco de papel com a identificação das bactérias e a repetição.

As raízes e a parte aérea das plantas de soja foram encaminhadas ao laboratório mantidas em Estufa a 160 C°/48 horas. Após decorrido este tempo, foi avaliado a contagem de número de nódulos e a massa seca de raiz e da parte aérea de cada planta, anotando também os resultados.

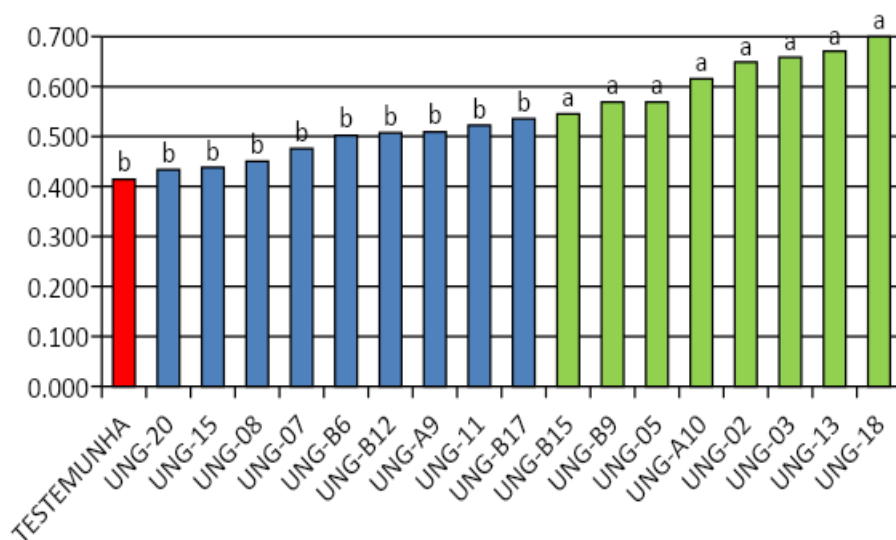
Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as medias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico da plataforma R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coleção de bactérias autóctones associativas aos nódulos foram formadas por 17 bactérias isoladas de nódulos de plantas de soja desenvolvidas em diferentes tipos de solo, variando em diversidade morfológica em meio de cultura. Elas foram identificadas, para que pudessem ser inoculadas nas sementes de soja para um novo plantio. A identificação das 17 bactérias foram: UNG-(B06, B09, B12, B15, B17, A09, A10, 02, 03, 05, 07, 08, 11, 13, 15, 18 e 20).

Ao avaliar a características agrônômica de peso da matéria seca radicular, MSR, as plantas advindas de tratamento de sementes com os microrganismos UNG (B15, B9, 05, A10, 02, 03, 13 e 18) foram agrupadas pelo teste Scott-Knott (0,05) e apresentaram diferenças significativas quando comparados com o tratamento controle e demais tratamentos (Figura 1). Os resultados mostraram que o potencial de desenvolvimento da raiz variou entre as diferentes bactérias a que foram submetidas, com destaque a UNG-18 que teve incremento de 69,5 % em relação a testemunha.

Figura 1 – Media da Massa Seca da Raiz em plântulas oriundas de tratamentos de sementes com microrganismos, aos 30 dias após semeio em substrato, Goiânia – GO, 2021.



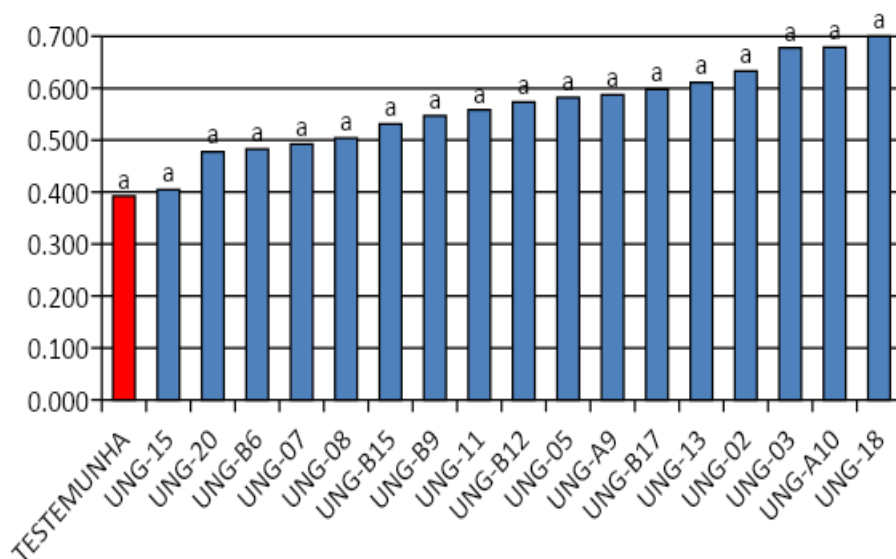
* As médias da massa seca radicular que possuem a mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5%. As médias foram transformadas pelo método de box-cox para atenderem a normalidade dos dados

Em um trabalho realizado por Da Costa *et al.*, (2014) mostraram interações significativas entres massa seca de raiz, massa seca da parte aérea, havendo interação significativa entre os fatores, o que sugeriu que o desempenho foi influenciado pela

inoculação com diferentes estirpes de rizóbios.

Em relação às médias da massa seca foliar (MSF) não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2). Provavelmente a não significância deveu-se ao curto espaço de tempo entre a semeadura e a mensuração da área foliar.

Figura 2 – Média da Massa Seca Foliar em plântulas de soja oriundas de tratamento de sementes com microrganismos aos 30 dias após semeio em substrato, Goiânia – GO, 2021.



*Medias que possuem a mesma letra nas columnas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5%

Ao mesmo tempo em que foram avaliados as massas secas da raiz e da parte aérea, foram observados a presença de nódulos em raízes de algumas plântulas, oriundas de microbiolização de sementes por microrganismos (Tabela 1). Estes dados evidenciam que algumas bactérias, mesmo em condições adversas, conseguiram realizar nodulação simbiótica com as plântulas de soja, mesmo sem a presença de inoculantes externos.

Tabela 1 – Contagem de nódulos após 30 dias do semeio, Goiânia – GO, 2021.

Tratamento	Origem do isolado	Número de nódulos totais
UNG-A9	Floresta nativa	1
UNG-8	Forrageiras	1
UNG-5	Forrageiras	7
UNG-2	Forrageiras	1
UNG-7	Forrageiras	1
UNG-A10	Floresta nativa	1
UNG-13	Cultivo de soja	1
UNG-B9	Floresta nativa	1
UNG-B6	Floresta nativa	1
UNG-B15	Floresta nativa	1
UNG-B17	Floresta nativa	30
UNG-18	Cultivo de soja	4

Na tabela 1, foi possível observar que de 17 bactérias inoculadas nas sementes, somente 12 bactérias conseguiram formar nódulos aos 30 dias depois do semeio, com destaque para a UNG-B17. Assim, pode ser que não ocorram nodulações maiores nas plantas por conta dos poucos dias de desenvolvimento.

Hungria, Campos, Mendes (2001), afirmaram também que algumas das causas da pouca nodulação ocorre por fatores biológicos e químicos do solo, sendo que a inoculação pode não resultar com sucesso, mas favorece o auxílio de rizóbios no solo, favorecendo a cultura futura. Este autores afirmam também que o período mais crítico para não ocorrer a fixação biológica é a inicial, e que estes fatores edafos prejudicam na sobrevivência dos rizóbios e na infecção das raízes.

Stralio (2012) analisou que a inoculação com rizóbios na cultura do feijoeiro que o indicativo para boa nodulação foi observado pela formação de nódulos por plantas, sendo superiores a 20 nódulos ativos. Em comparação a esse trabalho só foi possível ver mais de 20 nódulos no tratamento UNG-B17.

Apesar de algumas das plantas terem formado nódulos ou as outras terem poucos nódulos, as bactérias diazotróficas podem ficar na superfície da raiz da planta, sendo que 10% a 60% do N acumulado foi proveniente do N atmosférico (Sempere, 2018).

As bactérias autóctones associativas isoladas de nódulos de soja possuem papel importante como promotora de crescimento de plantas e possível papel de incremento da atividade de fixação biológica de nitrogênio. As bactérias que conseguiram formar nódulos nas raízes e ao mesmo tempo obtiveram incremento significativo no sistema

radicular de plântulas de soja, serão selecionadas para ensaios futuros, assim como a identificação por sequenciamento.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias isoladas de nódulos de soja UNG - (B15, B9, 05, A10, 02, 03, 13 e 18) foram capazes de promover incremento do sistema radicular que variou de 31,3 a 69,5 % da massa seca de raiz, comparado ao tratamento controle.

As bactérias UNG - (A9, A10, B9, B6, B15, B17, 08, 05, 02, 03, 07, 13 e 18) foram capazes de estabelecer simbiose nodulante com a leguminosa.

Portanto, estratégias que avaliam a diversidade de bactérias benéficas promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogénio no solo em que se pretendem introduzir a planta de interesse são de grande importância.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, Joseani M. Inoculação reduz custos com fertilizantes na soja. **Embrapa**, 23 set. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46716731/inoculacao-reduz-custos-com-fertilizantes-na-soja>. Acesso em: 7 maio 2020.
- CARRER FILHO, Renato; DIANESE, Ênrico de Campos; CUNHA, Marcos Gomes. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, GO, v. 45, n. 3, p. 356-363, 2015
- DA COSTA, Elaine M. et al. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014.
- DALL'AGNOL, Amélio. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.
- GAZZONI, Decio Luiz. A soja no Brasil é movida por inovações tecnológicas. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 3, p. 16-18, 2018.
- GAZZONI, Decio Luiz.; DALL'AGNOL, Amélio. Paralelo entre a soja no mundo e no Brasil. **Embrapa Soja-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2018.
- GUIMARÃES, Sérgio Moura. **PLANTIO DE SOJA (Glycinemax L.) EM DIFERENTES ARRANJOS CRUZADOS**. 2018.
- HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. *Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 2001.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-979, 1970.
- MANDARINO, José Marcos Gontijo. Origem e História da soja no Brasil. **Canal Rural**, [s. l.], 5 abr. 2017. Disponível em: <https://blogs.canalrural.com.br/embrapasoja/2017/04/05/origem-e-historia-da-soja-no-brasil/>. Acesso em: 8 mar. 2020.
- PRANDO, André Mateus et al. Coleção 500 Perguntas 500 Respostas - Soja. **Embrapa**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/publicacao.php?publicacaoid=90000041>. Acesso em: 24 maio 2020.
- ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. p.172.
- SEMPREBOM, Thais. Fixação biológica de nitrogênio e biotecnologia a favor das plantas. **Profissão Biotec**, 6 mar. 2018. Disponível em: <https://profissaobiotec.com.br/fixacao-biologica-de-nitrogenio-e-biotecnologia-favor-das-plantas/>. Acesso em: 25 mar. 2021.

STRALIOTTO, ROSÂNGELA. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. Embrapa, CNPAB. Agrobiologia. Seropédica, RJ, 2002.

ZILLI, Jerri; MARSON, Leandro Carvalho. Inoculação de sementes de soja com Bradyrhizobium. **Revista Cultivar**, [s. /], 2018. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/artigos/inoculacao-de-sementes-de-soja-com-bradyrhizobiumgencia-tecnologica-e-de-conhecimentos-na-agricultura>. Acesso em: 27 maio 202