

RUBENS ALVES DA SILVA JÚNIOR

**COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS EM SEMENTES DE
SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2019
Silva Júnior, Rubens Alves da, 1989-
Coinoculação de microrganismos benéficos em sementes de
soja com diferentes níveis de vigor / Rubens Alves da Silva
Júnior. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 78 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio Junio da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Semente - Qualidade. 2. Soja - Semente -
Inoculação. 3. Soja - Semente - Crescimento. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.3421

RUBENS ALVES DA SILVA JÚNIOR

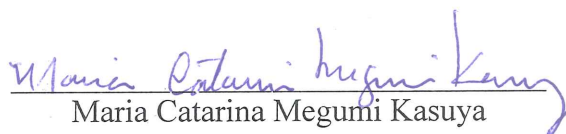
**COINOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS EM SEMENTES DE
SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2019.




Carla do Carmo Milagres



Maria Catarina Megumi Kasuya



Marliane de Cássia Soares da Silva
(Coorientadora)


Laércio Júnio da Silva
(Orientador)

*Eu sou a videira, e o meu pai é o lavrador.
Todo ramo que, estando em mim, não dá fruto, ele corta.
Todo ramo que dá fruto, ele poda, para que produza ainda mais.*

João 15:1 e 2

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha saúde, oportunidades e força para superar as dificuldades ao longo da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Professor Laércio Junio da Silva pela oportunidade, orientação, ensinamento, calma e amizade.

À Marliane de Cassia Soares da Silva e à Professora Maria Catarina Megumi Kasuya por todo ensinamento, orientação, paciência e admirável convívio.

Aos amigos e colegas do laboratório de sementes, laboratório de associações micorrízicas, laboratório de nutrição mineral e laboratório de recursos genéticos pelos ensinamentos e apoio técnico.

Ao grupo de estudo GSEM, estagiários e a todos os guerreiros da Paiva Team Jiu-Jitsu pelos ensinamentos, amizade e força diária.

À minha família tão querida, especialmente meus pais Rubens Alves da Silva e Leidimar Cavalcante de Araújo da Silva pelo carinho, apoio e ensinamento.

Aos pais da minha noiva Alcimar Enéas Rocha Trancoso e Idiomar Cândida dos Reis Trancoso pelo carinho e apoio.

Ao amor da minha vida Ana Clara Reis Trancoso que teve um papel muito grandioso nesse trabalho. Muito obrigado por todo carinho, paciência, apoio e amor!

A todos que apoiaram esse trabalho, sem o esforço de cada um de vocês não seria possível a execução.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Rubens Alves da Silva Júnior, nasceu em Araguaína -TO, no dia 01 de outubro de 1989.

Filho de Leidimar Cavalcante de Araújo da Silva, professora, e Rubens Alves da Silva, 1º sargento reformado e professor.

Em 2010 iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, formando-se em dezembro de 2016.

Na graduação fez intercâmbio em Normal, Illinois – EUA, onde aprimorou a língua inglesa e aprendeu sobre a agricultura local durante o período de agosto de 2013 a dezembro de 2014.

Em 2017 deu início ao curso de mestrado na área de Tecnologia e Produção de Sementes do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
Capítulo I. ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA ORIGINADAS DE SEMENTES COINOCULADAS COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS E DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR.	8
Chapter I. ESTABLISHMENT OF SOYBEAN SEEDLINGS FROM SEEDS CO-INOCULATED WITH BENEFICIAL MICROORGANISMS AND DIFFERENT LEVELS OF VIGOR.	10
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
TRATAMENTOS	15
LOTES DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR	16
OBTENÇÃO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS	16
CARACTERIZAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES	17
EXPERIMENTO DE COINOCULAÇÃO	19
PREPARO E ANÁLISE DE SOLO	20
INOCULAÇÃO DE SEMENTES	20
ANÁLISES DE PLÂNTULAS	23

ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
QUALIDADE DAS SEMENTES	25
ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS.....	26
CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
Capítulo II. DESEMPENHO VEGETATIVO E PRODUTIVO DE PLANTAS DE SOJA ORIGINADAS DE SEMENTES COINOCULADAS COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS E DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR.....	45
Chapter II. VEGETATIVE AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF SOYBEAN PLANTS ORIGINATED FROM SEEDS CO-INOCULATED WITH BENEFICIAL MICROORGANISMS AND DIFFERENT LEVELS OF VIGOR.	47
.....	47
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
TRATAMENTOS	52
LOTES DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR.....	52
OBTENÇÃO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS	53
CARACTERIZAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES	54
EXPERIMENTO DE COINOCULAÇÃO	56
PREPARO, ANÁLISE E ADUBAÇÃO DO SOLO	56
INOCULAÇÃO DE SEMENTES.....	57
SEMEADURA E CONDUÇÃO DAS PLANTAS	59

AVALIAÇÃO VEGETATIVA	60
AVALIAÇÃO PRODUTIVA.....	62
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
QUALIDADE DAS SEMENTES	63
CRESCIMENTO DE PLANTAS E PRODUTIVIDADE.....	64
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Concentração de células viáveis de microrganismos benéficos utilizadas no tratamento de coinoculação com <i>B. japonicum</i> em sementes de soja cultivar M 7110 IPRO.	21
Tabela 2. Doses e volumes de calda dos inoculantes utilizados em associação com o <i>B. japonicum</i>	21
Tabela 3. Umidade, germinação e testes de vigor em lotes de sementes de soja submetidas ao envelhecimento artificial por zero, 10 e 20 horas.	26
Tabela 4. Resumo da análise de variância dos dados obtidos com a avaliação de plântulas oriundas de sementes tratadas com <i>B. japonicum</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA.	28
Tabela 5. Emergência e índices de crescimento de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.....	30
Tabela 6. Emergência e índices de crescimento de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes inoculadas com <i>B. japonicum</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA.....	31
Tabela 7. Tempo para 50% de emergência de plantulas (T50%) e tempo médio de emergência de plântulas (TME) de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA.....	32
Tabela 8. Resumo da análise de variância para os dados de comprimento e volume de raízes de plântulas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA.....	34
Tabela 9. Volume de raízes com diâmetro de 1,0 a 1,5 mm de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA.....	37

Capítulo II

Tabela 1. Concentrações de células viáveis de microrganismos benéficos utilizadas no tratamento de coinoculação com <i>B. japonicum</i> em sementes de soja cultivar M 7110 IPRO.	58
Tabela 2. Doses e volumes de calda dos inoculantes utilizados em associação com o <i>B. japonicum</i>	58
Tabela 3. Umidade, germinação e testes de vigor em lotes de sementes de soja submetidas ao envelhecimento artificial por zero, 10 e 20 horas.	64
Tabela 4. Resumo da análise de variância das características fisiológicas e morfológicas de plantas de soja cv M 7110 IPRO em R2, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com <i>B. japonicum</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA..	66
Tabela 5. Resumo da análise de variância dos dados de produtividade de plantas de soja cv M 7110 IPRO, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com <i>B. japonicum</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA	70
Tabela 6. Características de produção de plantas de soja cultivar M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. asperellum</i> e FMA	71

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1. Preparo do substrato e das bandejas para o teste de emergência de plântulas. A - Solo não cultivado, peneirado e não autoclavado, B - areia peneirada e não autoclavada, C - substrato na mistura 2:1 e D - bandejas com capacidade de três litros..... 20
- Figura 2. Processo de coinoculação das sementes com *B. japonicum* em associação com microrganismos benéficos. A - Aplicação dos inóculos comerciais, B - aplicação de FMA no substrato em bandejas de emergência, CB - calda base de coinoculação e Pi - pipeta de inoculação..... 22
- Figura 3. Experimento em casa de vegetação. A - Arranjo de bandejas em blocos, B - Bloco de bandejas após a semeadura, C e D - Bandejas com plântulas de soja emergidas 24
- Figura 4. Volume de raízes de plântulas de soja cv M 7110 oriundas de diferentes diâmetros de raízes e níveis de vigor de sementes 35
- Figura 5. Volume de raízes de plântulas de soja cv M 7110 oriundas de diferentes diâmetros de raízes e coinoculações de microrganismos benéficos em sementes 36

Capítulo II

- Figura 1. Preparo dos vasos para a semeadura da soja. A - Solo não cultivado, peneirado e não autoclavado; B - areia peneirada e não autoclavada; C - substrato na mistura 2:1; D - fertilização com fósforo e potássio, E - fertilização de fósforo centralizada nos vasos; e F - vasos experimentais arranjados em bloco..... 57
- Figura 2. Processo de coinoculação das sementes com *B. japonicum* em associação com microrganismos benéficos. A - Aplicação dos inóculos comerciais, B - aplicação de FMA no substrato em vasos de crescimento, CB - calda base de coinoculação e Pi - pipeta de inoculação..... 59
- Figura 3. A - plantas em fase final de vegetação (R2) com 50 dias de desenvolvimento e B - plantas em fase de colheita (R8) com 110 dias de desenvolvimento..... 60

Figura 4. Características fisiológicas e morfológicas por planta de soja cv M 7110 IPRO em R2, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com *B. japonicum* e coinoculadas com diferentes microrganismos benéficos. * - significativo a 5 % e ** - significativo a 10 % de probabilidade pelo teste Dunnett em relação ao controle. As barras representam o desvio padrão, A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares, B - *Bradyrhizobium japonicum* e controle - somente *Bradyrhizobium japonicum* 67

Figura 5. Estruturas de fungos micorrízicos arbusculas em raízes de soja. A, C e E - arbúsculos, B - hifas, D - esporo e F-Vesícula..... 69

RESUMO

SILVA JÚNIOR, Rubens Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Coinoculação de microrganismos benéficos em sementes de soja com diferentes níveis de vigor.** Orientador: Laércio Junio da Silva. Coorientadora: Marliane de Cassia Soares da Silva.

A qualidade das sementes é extremamente importante durante todo desenvolvimento da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Ela atua direta e indiretamente durante a emergência das plântulas, no desenvolvimento vegetativo e na produtividade dos grãos. Assim, quando a qualidade das sementes utilizada no plantio é reduzida, a lavoura como um todo também é afetada. Conseqüentemente o estande de plantas é reduzido, o crescimento da planta é alterado e a produção comprometida. Pensando nisso, é possível que os microrganismos benéficos, através de diversificados mecanismos de ação, diminuam os efeitos negativos das sementes de baixo vigor e ainda estimulem o crescimento das plantas. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos principais microrganismos benéficos em coinoculação em sementes de soja com diferentes níveis de vigor no estabelecimento, desenvolvimento e produtividade da das plantas. Sementes de soja, cultivar M 7110 IPRO, produzidas na safra 2016/2017, foram submetidas ao envelhecimento artificial para a obtenção de três níveis de vigor: alto, médio e baixo. Foi realizada a coinoculação das sementes com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, associada com os microrganismos benéficos: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Foram conduzidos dois experimentos, em casa de vegetação, em delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições. O experimento 1 foi conduzido em esquema fatorial 3 x 6, ou seja, três níveis de vigor das sementes e quatro coinoculações, mais dois controles, que consistiram nas sementes inoculadas apenas com o *B. japonicum* e sementes não tratadas. Foram avaliados parâmetros de crescimento de plântulas aos 15 dias após a semeadura: Porcentagem e velocidade de emergência de plântulas, crescimento de plântulas, índice SPAD e morfologia do sistema radicular. O experimento 2 foi conduzido em esquema fatorial 3 x 5, ou seja, três níveis de vigor das sementes e quatro inoculações mais um controle, que consistiu nas sementes inoculadas apenas com o *B. japonicum*. Foram avaliados parâmetros de crescimento e produtividade no estágio de floração plena e colheita, respectivamente: índice SPAD, número de folhas trifolioladas, área foliar, matéria seca de plantas, nitrogênio total em

folhas, número de nódulos, matéria seca de nódulos, colonização micorrízica, número de vagens, número de sementes por planta, peso de 100 sementes, tamanho de sementes e produção de sementes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey, para os níveis de vigor de sementes, e Dunnett, para as coinoculações ($p \leq 0,05$). As coinoculações, principalmente com FMA, promoveram o aumento do volume radicular, comprimento, índices de desenvolvimento e vigor de plântulas de soja quinze dias após a semeadura. O crescimento vegetativo das plantas de soja foi maior quando comparado com o controle (semente inoculada apenas com *B. japonicum*). Além disso, a desuniformidade das características de produção, causadas pela variação do vigor de sementes, foi atenuada com as coinoculações de microrganismos benéficos. Vale ressaltar que nenhuma coinoculação promoveu redução no desenvolvimento das plantas de soja. Portanto, as coinoculações de microrganismos benéficos em sementes de soja com diferentes níveis de vigor podem contribuir para o estabelecimento de plântulas, para o rápido crescimento vegetativo e para a uniformização das características de produção da cultura da soja.

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, Rubens Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Co-inoculation of beneficial microorganisms in soybean seeds with different levels of vigor.** Adviser: Laércio Junio da Silva. Co-adviser: Marliane de Cassia Soares da Silva.

Seed quality is extremely important throughout the development of the soybean crop (*Glycine max* (L.) Merrill). It acts directly and indirectly during seedling emergence, vegetative growth and grain yield. Thus, when the quality of the seed used for field establishment is affected, the crop is also affected. Hence, the plant stand is reduced, plant growth is altered, and the production is compromised. In this context, it is possible that the beneficial microorganisms, through several mechanisms of action, reduce the negative effects of low-vigor seeds and still stimulate the growth of plants. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of the main beneficial microorganisms in co-inoculation in soybean seeds with different levels of vigor in the establishment, development and productivity of the plants. Soybean seeds, cultivar M 7110 IPRO, produced in the 2016/2017 growing season, were submitted to artificial aging to obtain three levels of vigor: high, medium and low. The seeds were co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, associated with beneficial microorganisms: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Two experiments were conducted in a greenhouse, in a randomized complete block design, with four replications. In experiment 1, a 3 x 6 factorial scheme was used, i.e., three levels of seed vigor and four co-inoculations plus two controls, which consisted of seeds inoculated only with *B. japonicum* and untreated seeds. Plant growth parameters were evaluated at 15 days after sowing: Seedling emergence, seedling growth, SPAD index, and root morphology. In the experiment 2, a 3 x 5 factorial scheme was used, i.e., three levels of seed vigor and four co-inoculations plus one control, which consisted of seeds inoculated only with *B. japonicum*. Growth and productivity parameters were evaluated at the full flowering stage (vegetative stage) and harvest (productive stage), respectively: SPAD index, number of trifoliolate leaves, leaf area, dry matter of plants, total nitrogen in leaves, number of nodules, dry matter of nodules, mycorrhizal colonization, number of pods, number of seeds per plant, weight of 100 seeds, seed size and seed production. The data obtained were subjected to the Shapiro-Wilk normality test and to Analysis of Variance. The means of the treatments were

compared by the Tukey test, for seed vigor, and Dunnett test, for the co-inoculations ($p \leq 0.05$). The co-inoculation, mainly with AMF, promoted greater root volume, seedling length, rates of development and vigor of soybean seedlings fifteen days after sowing. The vegetative growth of the soybean plants was greater compared with the control (seed inoculated only with *B. japonicum*). In addition, the non-uniformity of the production characteristics, caused by the seed vigor variation, was attenuated with co-inoculations of beneficial microorganisms. It is noteworthy that no co-inoculation promoted reduction in the development of soybean seedlings. Therefore, co-inoculations of beneficial microorganisms in soybean seeds with different levels of vigor can contribute to the seedling establishment, rapid vegetative growth and uniformization of soybean production characteristics.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie centenária que pertence à família *Fabaceae* de porte herbáceo, com ciclo de vida variado e hábito de crescimento diversificado (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Além disso, possui desenvolvimento vegetativo e reprodutivo muito bem definidos, mas que são fortemente influenciados por fatores genéticos e ambientais (FEHR; CAVINESS, 1977). Fatores esses que podem alterar a indução floral, crescimento vegetativo, altura de planta, número de ramificações, maturação e até o peso das sementes produzidas (BARROS; SEDIYAMA, 2009). Assim, há flexibilização do crescimento da cultura da soja em uma ampla faixa de ambientes.

Não é por acaso que a safra brasileira bate recordes todos os anos. Na última safra, 2017/2018, foi verificado o recorde de 119 milhões de toneladas de grãos produzidos no Brasil (CONAB, 2018). Esse número mostra a expectativa que o sojicultor brasileiro está vivendo em relação ao futuro da soja no Brasil e no mundo, e os motivos são vários. Destaca-se as projeções do aumento populacional nos próximos 30 anos, a produção de biodiesel, corte de impostos na cadeia produtiva e a disponibilidade de áreas para a produção dessa leguminosa (AGNOL; HIRAKURI, 2008).

A soja ocupa papel de destaque entre as principais culturas agrícolas no mundo devido a sua importância econômica. O grão e seus principais aditivos, farelo e óleo, desempenham grande importância nos derivados da alimentação humana e animal, destacando-se assim como um dos bens mais exportados do Brasil. Além disso, os grãos de soja podem ser usados na produção de biodiesel e vários outros seguimentos no mercado mundial. Outras áreas envolvidas em toda cadeia produtiva da soja também vêm crescendo com o cultivo, por exemplo as tecnologias de produção: maquinários, softwares, adubação, defensivos, inoculantes, mão de obra e outros.

Apesar do notado crescimento em diversas áreas da cadeia produtiva da soja é difícil imaginar que os produtores vêm sofrendo com a baixa qualidade de sementes no momento do plantio de suas lavouras. (SÁ; AZEVEDO, 2012; CAMPO & NEGÓCIOS, 2015; OLIVI; PIMENTA, 2018). A semente é um insumo de extrema importância para o estabelecimento e produção de lavouras de diversas espécies cultivadas. Tão importante que movimenta cerca de 10 bilhões de reais ao ano no Brasil (GALLOTTO, 2017). Para fazer parte dessa fatia no mercado de sementes vários produtores atendem requisitos mínimos estabelecidos por lei, e até outros mais restritos, afim de melhorar a qualidade e se adequar ao mercado de sementes (BRASIL, 1997, 2004a, 2004b, 2005, 2013).

Contudo, essas exigências aumentam muito os custos de produção e acabam refletindo também em sementes de elevado valor comercial para os produtores. Apesar de todo controle de fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na produção de sementes certificadas, a comercialização de sementes piratas ainda consome boa parte da demanda necessária de semente para o plantio da soja no Brasil (CAMPO & NEGÓCIOS, 2015). Certos produtores, a fim de economizar com custos de produção usam esse material sem certificação para lucrar mais, porém não é o que acontece na maioria dos casos.

Essas sementes não certificadas tem como principais prejuízos a proliferação de doenças, a redução na germinação, baixo vigor, perda da garantia genética e baixa garantia de produção (SÁ; AZEVEDO, 2012). Assim, dentre os vários fatores que influenciam a produção de uma lavoura, a semente tem o papel principal. Ela é a responsável por carregar vários atributos de qualidade física, fisiológica, sanitária e genética, que são determinantes para o bom desempenho de uma lavoura. (MARCOS FILHO, 2015). Esse conjunto de atributos é imprescindível para obtenção de sementes de qualidade, no entanto a sua definição e entendimento é de difícil compreensão

A análise do conjunto destas características é conhecida como vigor de sementes. De acordo com FINCH-SAVAGE; BASSEL (2016) o conceito de vigor mais aceito é definido por Perry como ‘a soma de todas as propriedades da semente que determinam o nível do potencial das atividades e performance das sementes durante a germinação e emergência de plântulas’ e redefinido pela ISTA como ‘a soma das propriedades que determinam a atividade e performance de lotes de sementes com aceitável germinação em ampla gama de ambientes’. Assim, o vigor é analisado observando o comportamento de várias características da semente e desenvolvimento de plântulas, como a velocidade de germinação, comprimento de raízes, hipocótilo, massa seca e outros critérios que determinam a sua qualidade.

Dessa maneira, várias empresas de sementes e instituições de pesquisas adotam as análises de vigor como padrões de controle interno de qualidade de lotes de sementes que podem ser destinados a comercialização ou não. Por meio destes testes de vigor, as empresas conseguem detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes com germinação semelhante, distinguir lotes de alto e baixo vigor e separar lotes em diferentes níveis de qualidade (MARCOS FILHO, 1999). Contudo, a determinação da qualidade depende não só do histórico dos lotes de sementes, ou seja, a sua produção realizada com os requisitos mínimos de qualidade, mas também pela escolha adequada dos testes de vigor e a interpretação dos dados.

Então, o uso de sementes de qualidade é imprescindível para quem deseja altas produtividades. De modo geral, as sementes de boa qualidade garantem o estabelecimento inicial, um desenvolvimento vigoroso e produtividades consistentes na lavoura. De acordo com FINCH-SAVAGE; BASSEL (2016), quando o lote possui vigor reduzido os efeitos negativos podem ocorrer de maneira direta e indireta na lavoura como um todo. O impacto direto é notado no início do desenvolvimento da cultura, ou seja, baixa emergência de plântulas em campo. Já o efeito indireto é notado na produção, uma vez que o estande ideal de plantas não é atingido. Dessa maneira, é importante encontrar soluções que influenciem positivamente o desenvolvimento fisiológico e morfológico de plantas de soja durante todas as fases de desenvolvimento da cultura, porque assim será possível cortar custo e aumentar a produtividade.

Mesmo que os hábitos de crescimento da cultura da soja já estejam muito bem estabelecidos o seu desenvolvimento ainda pode variar de acordo com vários outros fatores. De acordo com WHITE et al. (2015), o crescimento das plantas de modo geral ainda é bastante complexo e altamente dependente do fluxo de recurso dentro e fora da planta. Basicamente podem ser influenciadas por fatores genéticos, pela dinâmica entre a fonte e dreno e por fatores ambientais. Principalmente por recursos externos a planta, uma vez que estão sob constantes mudanças.

Essas oscilações acabam provocando mudanças nas necessidades e no consumo das plantas podendo alterar a dinâmica entre a fonte e dreno. Em síntese, é possível fazer inferências sobre vários fatores externos e internos de crescimento. Já que a maioria das plantas, em nenhum momento durante o desenvolvimento, estarão sob totais e ótimas condições de crescimento (WHITE et al., 2015). Sendo assim, dentre os vários fatores externos que influenciam o crescimento das plantas, o uso de microrganismos benéficos pode fornecer soluções ao problema que os produtores de soja vêm enfrentando quanto ao uso de sementes de baixa qualidade.

O Brasil é um país modelo quando se trata do uso de microrganismos benéficos na agricultura (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Principalmente daqueles que possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, por exemplo as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Essas bactérias são muito bem conhecidas pela sua eficiência em fixar nitrogênio atmosférico no solo e associar com plantas da família *Fabaceae*. Não é por acaso que essas bactérias são amplamente utilizadas no plantio de espécies leguminosas, como agentes biológicos fixadores de nitrogênio, principalmente na cultura da soja. O Brasil já desenvolve há muito tempo um bioinsumo de grande impacto econômico e ambiental, formulado com bactérias que fixam o nitrogênio atmosférico (LOPES, 2018).

Há outros microrganismos benéficos com diferentes funções como *Azospirillum brasilense* que altera os estímulos hormonais de crescimento (FUKAMI et al., 2017), *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* que controla ou compete com microrganismos patogênicos (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005; HARMAN, 2006) e os FMA que aumentam o aporte de água e nutrientes para as plantas (JACOBY et al., 2017). Além de colaborar e atender à várias demandas sociais, econômicas e ambientais em prol de uma agricultura mais sustentável (CHAPARRO et al., 2012). Pensando nisso, a combinação de mais de um microrganismo poderia ser ainda mais benéfico e vantajoso ao desenvolvimento de plantas originadas de sementes menos vigorosas, mas que mesmo assim atendessem aos requisitos mínimos de comercialização (BRASIL, 2013).

A técnica da coinoculação é realizada a partir da combinação de microrganismos benéficos associados às plantas. Ela está fundamentada na adição de duas ou mais soluções concentradas de células viáveis de determinados microrganismos nas sementes, solo e outras estruturas vegetais. Assim, essas combinações podem maximizar os benefícios da associação de cada microrganismo inoculado as plantas, a partir de processos de sinergia dos seus mecanismos de ação. Destacam-se as coinoculações: *Azospirillum brasilense* com *Bradyrhizobium japonicum*, promovendo o aumento radicular, nodulação e produtividade (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013); *Bacillus subtilis* com *B. japonicum* incrementando o controle biológico de fungos patogênicos da soja e a promoção do crescimento radicular (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005); *Trichoderma asperellum* com *B. japonicum* promovendo o crescimento de plantas de soja e controle biológico de fungos patogênicos (HARMAN, 2006; AYOUBI; ZAFARI; MIRABOLFATHY, 2012); e FMA com *B. japonicum*, promovendo o crescimento de plantas leguminosas, o aporte de nutrientes e o vigor das plantas em condições de estresse (NADEEM et al., 2014; MEENA et al., 2018).

Diante do exposto, acredita-se que a sinergia e a ampliação dos mecanismos de ação, a partir da combinação dos microrganismos benéficos, possam amenizar os efeitos negativos que sementes de baixo vigor proporcionam a lavoura da soja. Assim, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da coinoculação, utilizando microrganismos benéficos em associação com *B. japonicum*, em sementes de soja com diferentes níveis de vigor durante o estabelecimento, desenvolvimento e produtividade da cultura da soja. Além de investigar e identificar quais coinoculações podem ser mais promissoras ao longo do desenvolvimento desta cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOL, A. D.; HIRAKURI, M. H. Circular Técnica 59: Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja. **EMBRAPA**, v. 59, p. 8, 2008.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.

AYOUBI, N.; ZAFARI, D.; MIRABOLFATHY, M. Combination of *Trichoderma* species and *Bradyrhizobium japonicum* in control of *Phytophthora sojae* and soybean growth. **J. Crop Prot.**, v. 1, n. 1, p. 67–79, 2012.

BARROS, H. B.; SEDIYAMA, T. Luz, umidade e temperatura. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina, PR: Mecenas, 2009. p. 17–27.

BRASIL. **Lei nº 9.456, de 25 abril de 1997**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9456.htm>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BRASIL. **Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003**. Brasil, 2004a. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/216570.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004**. Brasil, 2004b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/semntes-e-mudas/publicacoes-semntes-e-mudas/DecretoN5.153de23dejulhode2004.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BRASIL. **Instrução normativa nº 9, de 2 de junho de 2005**. Brasil, 2005. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/semntes-e-mudas/publicacoes-semntes-e-mudas/INN9de2dejulhode2005.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BRASIL. **Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013**. Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/semntes-e-mudas/publicacoes-semntes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2018.

CAMPO & NEGÓCIOS. **Sementes piratas invadem lavouras brasileiras**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2016/01/Matéria-Sementes-piratas-invadem-lavouras-brasileiras0001.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira. grãos, v.12 Safra 2017/18** - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-148, setembro 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 20 Set. 2018.

- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Special report**, v. 80, n. March, p. 11, 1977.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.
- FUKAMI, J. et al. 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, 2017.
- GALIOTTO, F. **Mercado de sementes movimentada R\$ 10 bi ao ano no Brasil**. Disponível em: <<https://www.abrates.org.br/noticia/mercado-de-sementes-movimentada-r-10-bi-ao-ano-no-brasil>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.
- 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, n. 7, p. 791–801, 2013.
- JACOBY, R. et al. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–19, 2017.
- LOPES, M. A. **A era dos insumos biológicos: como a biotecnologia é importante**. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2018/08/era-dos-insumos-biologicos-como-biotecnologia-e-importante.html>>. Acesso em: 31 jan. 2019.
- MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. DE B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 218.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015.
- MEENA, R. S. et al. Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 207–223, 2018.
- NADEEM, S. M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 429–448, 2014.
- OLIVI, J. B.; PIMENTA, I. **Mato Grosso quer plantar sementes próprias na 1ª quinzena de fevereiro**. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/videos/soja/227035-mato-grosso-quer-plantar-sementes-proprias-na-1-quinzena-de-fevereiro.html#.XD_cMVxKjIU>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SÁ, H. S.; AZEVEDO, D. B. **Pirataria de sementes: influências e riscos para o agronegócio brasileiro.** Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Pirataria-de-Sementes-influências-e-riscos-para-o-agronegócio-brasileiro.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita.** Viçosa, MG: UFV, 2015.

WHITE, A. C. et al. How can we make plants grow faster? A source-sink perspective on growth rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 31–45, 2015.

Capítulo I

ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA ORIGINADAS DE SEMENTES COINOCULADAS COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS E DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR.

RESUMO - A qualidade das sementes é de extrema importância no estabelecimento inicial da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Basicamente as sementes são responsáveis por carregar um conjunto de atributos que atuam diretamente no desenvolvimento da cultura. Todavia, vários produtores vêm se queixando da baixa qualidade das sementes de soja e das baixas produtividades que esse fator provoca. Algumas alternativas como a combinação de microrganismos benéficos pode ser um método econômico e sustentável para diminuir os efeitos negativos provocados por sementes de baixa qualidade. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da coinoculação, utilizando microrganismos benéficos em associação com *B. japonicum*, de sementes de soja com diferentes níveis de vigor no estabelecimento da cultura. Sementes de soja, cultivar M 7110 IPRO, produzidas na safra 2016/2017, foram submetidas ao envelhecimento artificial para a obtenção de três níveis de vigor: alto, médio e baixo. Foi realizada a coinoculação das sementes com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, associada com os microrganismos benéficos: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições. Foi utilizado esquema fatorial 3 x 6, ou seja, três níveis de vigor das sementes e quatro coinoculações, mais dois controles, que consistiram nas sementes inoculadas apenas com o *B. japonicum* e sementes não tratadas. Foram avaliados parâmetros de crescimento das plantas aos 15 dias após a semeadura: Emergência de plântulas, índices de crescimento, índice SPAD, análises radiculares (WinRhizo), matéria seca, comprimento hipocótilo e radícula. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey, para os níveis de vigor de sementes, e de Dunnett, para as coinoculações ($p \leq 0,05$). A coinoculação com FMA promoveu aumento do comprimento, do índice de crescimento e do vigor das plântulas de soja, quinze dias após a semeadura. Além disso, todas as coinoculações promoveram o aumento do volume radicular, especialmente em raízes com diâmetro de 1,0 a 1,5 mm de espessura. Vale ressaltar também que nenhuma inoculação promoveu redução o desenvolvimento das plântulas de

soja. Portanto, as coinoculações de microrganismos benéficos em associação com *B. japonicum* contribuíram para maior velocidade de emergência e maior crescimento de plântulas de soja, independentemente do vigor das sementes.

Palavras chaves: qualidade de sementes, crescimento vegetativo, fungos micorrízicos arbusculares, *Bradyrhizobium japonicum*.

Chapter I

ESTABLISHMENT OF SOYBEAN SEEDLINGS FROM SEEDS CO-INOCULATED WITH BENEFICIAL MICROORGANISMS AND DIFFERENT LEVELS OF VIGOR.

ABSTRACT - Seed quality is important in the establishment of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) crop. The seeds are responsible for carrying a set of attributes that act directly in the development of the culture. However, several producers have been complained about the low quality of soybeans seeds and the consequently low productivity. Therefore, some alternatives such as the combination of beneficial microorganisms can be an economical and sustainable strategy in relieving negative effects caused by low quality seeds. Thus, this study aimed to evaluate the effects of co-inoculation of ecofriendly microorganisms and *Bradyrhizobium japonicum* on soybean seeds with different levels of vigor during the establishment of the soybean crop. Soybean seeds, cultivar M 7110 IPRO, produced in the 2016/2017 growing season, were submitted to artificial aging to obtain three levels of vigor: high, medium and low. The seeds were co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, associated with beneficial microorganisms: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The experiment was conducted in a greenhouse in a randomized complete block design with four replicates. A 3 x 6 factorial scheme was used, i.e., three levels of seed vigor and four co-inoculations plus two controls, which consisted of seeds inoculated only with *B. japonicum* and untreated seeds. Plant growth parameters were evaluated at 15 days after sowing: Seedling emergence, seedling growth, SPAD index, and root morphology. The data obtained were subjected to the Shapiro-Wilk normality test and to Analysis of Variance. The means of the treatments were compared by the Tukey test, for the seed vigor, and Dunnett test, for the co-inoculations ($p \leq 0.05$). FMA co-inoculation promoted increase in length, growth rate and vigor of soybean seedlings fifteen days after sowing. In addition, all co-inoculations promoted an increase in root volume, especially in roots with a diameter of 1.0 to 1.5 mm. It is also worth mentioning that no inoculation promoted reduction in the development of soybean seedlings. Therefore, co-inoculations of ecofriendly microorganisms and *Bradyrhizobium japonicum* may contribute to the seedling emergence speed and soybean seedling growth, regardless to the seed vigor.

Keywords: seed quality, vegetative growth, arbuscular mycorrhizal fungi,
Bradyrhizobium japonicum.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas de maior importância econômica do Brasil (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). A safra brasileira de 2017/2018 foi 2,6 % superior à safra passada, o que permitiu atingir o recorde de produção de 117 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Além disso, as expectativas para o futuro da sojicultura no Brasil e no mundo são animadoras, e os motivos são vários. Os principais são as projeções do aumento da população mundial nos próximos 30 anos, o uso do óleo de soja na produção de biodiesel, exoneração de impostos na cadeia produtiva da soja e a grande disponibilidade ainda de áreas que permitem a produção dessa leguminosa (AGNOL; HIRAKURI, 2008).

O sucesso na produção de uma lavoura depende de diversos fatores, mas, sem dúvida, o bom desenvolvimento da cultura parte principalmente de sementes de alta qualidade. Contudo, ainda é possível encontrar no mercado sementes de soja com baixa qualidade, impedindo a garantia do estabelecimento e produção de lavouras de forma adequada (SÁ; AZEVEDO, 2012; CAMPO & NEGÓCIOS, 2015; OLIVI; PIMENTA, 2018).

A qualidade das sementes é determinada pela interação de um conjunto de características de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (MARCOS FILHO, 2015). No entanto, a determinação da qualidade de sementes passa por outro conceito que não é uma característica facilmente mensurável, o seu vigor. Lotes de sementes com elevado potencial de germinação, porém com baixo vigor, precisam de condições ótimas para apresentarem elevadas taxas de germinação. Assim, o baixo desempenho de lotes de sementes associado a condições não ideais é determinado pela diferença de vigor entre as sementes (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Dessa forma, as sementes têm a capacidade de carregar atributos que determinam o vigor das plantas e o desempenho da lavoura no campo.

Apesar das diferenças entre lotes serem facilmente determinadas a partir de testes rotineiros, a definição de vigor ainda não está totalmente estabelecida. De acordo com FINCH-SAVAGE; BASSEL (2016), as definições mais aceitas para vigor são ‘a soma de todas as propriedades da semente que determinam o nível do potencial das atividades e performance das sementes durante a germinação e emergência de plântulas’ proposta por Perry. A partir dessa definição, a ISTA (International Seed Testing Association) define vigor como ‘a soma das propriedades que determinam a atividade e performance de lotes de sementes com aceitável germinação sob ampla gama de ambientes’.

O estabelecimento inicial da cultura é de extrema importância para um desenvolvimento vigoroso e produtivo. De acordo com FINCH-SAVAGE; BASSEL (2016), os efeitos negativos da variação do vigor nas sementes ocorrem de maneira direta e indireta em uma lavoura. O impacto direto é perceptível no estabelecimento da cultura, ou seja, na baixa emergência de plântulas em campo. Já o efeito indireto causa redução na produção, uma vez que o estande de plantas ideal não é atingido. Nesse sentido, é importante encontrar soluções que influenciem positivamente o desenvolvimento fisiológico e morfológico de plantas de soja durante o estabelecimento da cultura, principalmente a fim de amenizar os efeitos provocados pela utilização de sementes de baixa qualidade, ou então, por condições de estresse, como déficit hídrico, altas temperaturas, que afetam a germinação e emergências das plântulas (VIEIRA et al., 2013; SOARES et al., 2015; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Algumas alternativas são apontadas como promissoras para amenizar os efeitos negativos em decorrência da utilização de sementes de baixo vigor, dentre elas a utilização de microrganismos benéficos. Atualmente o Brasil é um país modelo quando se trata do uso destes microrganismos na agricultura (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). As respostas às inoculações com microrganismos benéficos estão associadas a alterações na estrutura morfológica e na promoção do crescimento das plantas de três maneiras: alteração dos estímulos hormonais na planta; controle ou competição com microrganismos patogênicos; e aumento do aporte de água e nutrientes para as plantas (JACOBY et al., 2017).

Assim, esses microrganismos benéficos podem atuar como biofertilizantes, bioestimulantes, auxiliar no controle de pragas e doenças, alterando de forma direta e/ou indireta o desenvolvimento de várias culturas agrícolas, como a soja (HARMAN, 2006; SUBRAMANIAN et al., 2015; MEENA et al., 2018). De modo geral, estes microrganismos podem estimular o crescimento das plantas, alterando as estruturas das raízes, produzindo hormônios de crescimento (auxina, giberilina, citocinina, etileno e ABA), aumentando a disponibilidade de água e nutrientes (P, N, K, Mg, Cu, e Zn), aliviando sintomas de estresse provocados por metal pesado, salinidade, restrição hídrica e até agindo no controle de pragas e doenças (BENÍTEZ et al., 2004; NADEEM et al., 2014; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014; LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015; PARRAY et al., 2016; PARK et al., 2017).

Dentre os vários microrganismos benéficos disponíveis no mercado brasileiro, podemos destacar três grupos principais. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), os fungos promotores de crescimento de plantas (PGPF) e as micorrizas

promotoras de crescimento de plantas (FMA). As principais PGPR são formadas pelos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Bacillus*; os PGPF são formados pelo gênero *Trichoderma*; e os FMA por micorrizas de fungos arbusculares (BODDEY; HUNGRIA, 1997; HARMAN, 2006; MIRANSARI et al., 2009; GALINDO et al., 2018). A fim de estabelecer padrões para comercialização e uso destes microrganismos, o Brasil avalia e aprova produtos por meio de uma série rigorosa de normas e protocolos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2010, 2011).

De maneira geral, as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* compõem o grupo de microrganismos benéfico mais conhecido na agricultura brasileira, principalmente por sua eficiência em fixar o nitrogênio atmosférico no solo e associar com plantas da família *Fabaceae*. Para a cultura da soja, as espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio mais usadas são o *Bradyrhizobium japonicum* e o *Bradyrhizobium elkanii* (BODDEY; HUNGRIA, 1997). Essas bactérias são amplamente utilizadas no plantio dessa espécie leguminosa porque geram grande economia para os produtores rurais no uso de fertilizantes nitrogenados (LOPES, 2018). A associação simbiótica entre o *Bradyrhizobium* e as plantas de soja forma uma estrutura chamada de nódulo, local onde a fixação biológica de nitrogênio é mais intensa.

A formação de nódulos e desenvolvimento das bactérias inicia-se através da expressão de genes que são ativados pela presença de compostos químicos exsudados pelas plantas e bactérias. Assim, quando os nódulos estão em intensa fixação biológica de nitrogênio é possível notar no interior dos nódulos uma coloração rósea avermelhada. Esta coloração é característica da atividade da leghemoglobina que tem a função de transportar oxigênio, importante para as atividades vitais de microrganismos aeróbicos como os dessa espécie (HUNGRIA et al., 2010). Além da fixação biológica de nitrogênio as bactérias do grupo *Bradyrhizobium* possuem papel fundamental em outras atividades. Boiero et al. (2007) verificaram que estirpes de *Bradyrhizobium* usadas na inoculação de plantas de soja nos Estados Unidos, Canadá e países da América do Sul possuem capacidade também de produzir os principais fitohormônios de crescimento: auxina, giberilina, citocinina, etileno e ácido abscísico.

Assim, levando em consideração a importância do Brasil na aplicação de microrganismos benéficos no setor agrário, principalmente daqueles que possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, a coinoculação pode ser também uma alternativa para estimular o desenvolvimento e a produtividade de lavouras de soja (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Com esta ferramenta os produtores podem

reduzir custos e ainda aumentar a capacidade de produção das plantas, mesmo sob condições de estresse. Além do mais, essa técnica colabora e atende várias demandas sociais, econômicas e ambientais (CHAPARRO et al., 2012).

A técnica da coinoculação consiste na combinação de mais de um destes microrganismos benéficos às plantas. Ela tem como base a adição de duas ou mais soluções concentradas de células de determinados microrganismos benéficos nas sementes, solo ou outras estruturas vegetais. Dessa forma, as combinações podem maximizar os benefícios da associação dos microrganismos às plantas a partir da amplificação dos seus mecanismos de ação. Entretanto, a eficiência destes mecanismos de ação pode depender não só das características das bactérias ou dos fungos, mas também das características do solo e das plantas as quais irão se associar (NADEEM et al., 2014).

Assim, a coinoculação de sementes de soja com microrganismos benéficos em associação com o *B. japonicum* poderia ser uma alternativa viável visando ao aumento da porcentagem de emergência e crescimento de plântulas de soja, além de contribuir para amenizar os efeitos da baixa qualidade das sementes. Diante disso, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da coinoculação, utilizando microrganismos benéficos em associação com *B. japonicum*, de sementes de soja com diferentes níveis de vigor no estabelecimento da cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, no período de fevereiro a maio de 2018. Foram utilizadas sementes de soja da cultivar M 7110 IPRO, produzidas na safra 2016/2017 em Paracatu, Minas Gerais. Três lotes de sementes com diferentes níveis vigor foram inoculados com *Bradyrhizobium japonicum* em associação com microrganismos benéficos *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e Fungos Micorrízicos Arbusculares. Para isso foi estabelecido os seguintes tratamentos e determinações:

TRATAMENTOS

Os tratamentos foram constituídos por três níveis de vigor de sementes – alto, médio e baixo; e pela inoculação das sementes com os seguintes microrganismos em associação com o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080:

1. *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium japonicum*;
2. *Bacillus subtilis* + *Bradyrhizobium japonicum*;
3. *Trichoderma asperellum* + *Bradyrhizobium japonicum*;
4. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) + *Bradyrhizobium japonicum*;
5. *Bradyrhizobium japonicum* (controle 1);
6. Sementes não inoculadas (controle 2).

Afim de evitar incompatibilidades e interações com os microrganismos, nenhum outro tratamento de sementes foi realizado. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 3 x 6, ou seja, três níveis de vigor de sementes e seis níveis de coinoculação, totalizando dezoito tratamentos.

LOTES DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR

Para obtenção dos lotes de sementes com diferentes níveis de vigor, um lote matriz foi dividido em três partes iguais de 1 kg e submetidos ao processo de envelhecimento artificial (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004). As sementes de cada lote foram organizadas sobre tela metálica acoplada a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada. Em seguida, as caixas foram organizadas em uma câmara tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) e mantidas a 42 °C por diferentes períodos, para obtenção de três níveis de vigor (MARCOS FILHO, 1999).

O lote de sementes de alto vigor foi formado por sementes não submetidas ao envelhecimento artificial. Já os lotes de sementes de médio e baixo vigor foram submetidos a 10 e 20 horas de envelhecimento artificial, respectivamente. Estes tempos foram determinados por meio de testes preliminares que permitiram a redução da qualidade das sementes e ao mesmo tempo que ficassem acima dos padrões mínimos estabelecidos pelo MAPA para serem comercializadas (BRASIL, 2013).

OBTENÇÃO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS

As análises para a caracterização dos microrganismos foram conduzidas no Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Foram utilizadas fontes comerciais das rizobactérias promotoras de crescimento *Azospirillum brasilense* AbV-5, *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 e o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080, bem como o fungo *Trichoderma asperellum* URM 5911.

Os isolados de FMA *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, www.furb.br/cicg) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, SC. Estes isolados foram multiplicados em solo:areia (1:1, v:v) e cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf).

Os produtos comerciais contendo as bactérias promotoras de crescimento de plantas e o fungo *T. asperellum* tiveram suas concentrações verificadas de acordo com o método de diluição seriada, seguido de semeadura em meio de cultura. As diluições 10^{-1} dos produtos comerciais contendo as bactérias foram preparadas com a aplicação de alíquotas de 1,0 mL das amostras em tubos tipo Falcon contendo 9,0 mL de solução salina ($8,5\text{g L}^{-1}$ de NaCl) autoclavada. Para o fungo *T. asperellum*, a diluição de 10^{-1} foi obtida a partir de 0,1 g dos grânulos comerciais diluídos em 0,9 mL da mesma solução salina.

Posteriormente foram feitas diluições até as concentrações 10^{-6} e 10^{-7} dos inoculantes. Em seguida, alíquotas de 100 μL das diluições dos inoculantes foram espalhadas em placas de petri contendo 20,0 mL de meio de cultura YMA, LGI e BDA. Após a inoculação, nos meios de cultura, as placas foram incubadas em câmara tipo BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o crescimento das colônias microbianas. Os resultados foram expressos em unidade de formação de colônias por mL de inoculante (UFC/mL).

Os isolados de FMA tiveram a concentração de esporo avaliada de acordo com o método do peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963). Assim, amostras do solo de multiplicação de FMA foram peneiradas e centrifugadas com solução de sacarose a 50%. Depois, os esporos foram recolhidos, depositados em placa de Petri canaletadas e contados em microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes.

CARACTERIZAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES

A caracterização dos lotes de sementes foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Estes foram analisados quanto ao teor de água, germinação e vigor por meio dos seguintes testes e determinações:

Teor de água - os lotes de sementes tiveram os seus teores de água determinados pelo método da estufa a $105 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 h (BRASIL, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Germinação - para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram dispostas em três folhas de papel *germitest* previamente

umedecidas com água destilada no volume de 2,5 vezes o peso do papel seco. Logo após, foram confeccionados rolos, os quais foram organizados e mantidos em germinador tipo Mangelsdorf, a 25 °C. No quinto e oitavo dia após a semeadura foi realizada a contagem de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009a).

Primeira contagem de germinação - o teste foi realizado junto com o teste de germinação. No quinto dia após a semeadura do teste de germinação foi contabilizado o número de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Envelhecimento acelerado - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes. Amostras de 42 g de sementes de cada lote foram organizadas sobre telas metálicas acopladas a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada. Em seguida, as caixas foram mantidas em câmara tipo BOD, a 42 °C, durante 48 h (MARCOS FILHO, 1999). Após este período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente. A avaliação do número de plântulas normais foi feita no quinto dia após a montagem do teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Condutividade elétrica - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram pesadas e em seguida colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada. Os copos contendo as sementes foram mantidos a 25 °C por 24 h. Após este período, foi determinada a condutividade elétrica da solução por meio do condutivímetro Digmed DM-31. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Emergência de plântulas - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com capacidade de três litros. Para isso, as bandejas foram preenchidas com uma mistura de solo e areia na proporção de 2:1, respectivamente. Após a semeadura, o substrato foi umedecido inicialmente até a capacidade de campo e irrigado sempre que necessário. A avaliação do número de plântulas emergidas foi realizada diariamente, sendo consideradas emergidas aquelas com os cotilédones completamente acima da superfície do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem. Com os dados da avaliação diária também foi calculado o índice de velocidade de emergência (NAKAGAWA, 1999).

Comprimento de plântulas - para a determinação do comprimento de plântulas foram utilizadas dez plântulas, coletadas na parte central de cada bandeja do teste de emergência. As plântulas foram retiradas com o auxílio de água corrente e peneira para evitar perda de raízes. Em seguida, as plântulas foram estendidas e fotografadas com câmera digital. Para medir os comprimentos de hipocótilo e radícula das plântulas foi

utilizado o software ImageJ[®] (FERREIRA; RASBAND, 2009). Os resultados foram expressos em centímetros.

Matéria seca de plântulas - após a aquisição das imagens, as plântulas tiveram suas estruturas separadas em hipocótilo e radícula. Estas foram então armazenadas em sacos de papel tipo Kraft para secagem, sendo utilizada uma estufa de circulação de ar forçado, pelo período de 72 h, a 65 °C. Após a secagem, o material foi pesado em balança de precisão (0,0001g) para determinação da matéria seca. Os resultados foram expressos em mg/plântula.

Teste de sanidade - foi conduzido de acordo com as normas descritas em BRASIL (2009b) e adaptações. Uma amostra de 400 sementes do lote matriz foi submetida ao teste tipo *Blotter*, no esquema 20 sementes x 20 caixas de plástico transparente tipo *gerbox*. Para evitar contaminações, o papel filtro foi esterilizado em estufa por 20 minutos à 160 °C e a água destilada para umedecer o papel foi autoclavada a 121 °C por 20 min. A montagem das caixas com as sementes foi realizada em uma câmara de fluxo laminar. As sementes foram distribuídas individualmente sobre o papel filtro umedecido com solução de 5 ppm de sal 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) e água destilada no volume de 2,5 vezes o peso do papel filtro seco.

Em seguida, as caixas foram envolvidas em sacos plástico transparente e incubadas em germinador por um período de sete dias. As caixas foram mantidas sob lâmpadas de luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 8 h sob luz e 16 h no escuro, na temperatura de 20 ± 2 °C. As sementes foram examinadas individualmente por meio de um estereomicroscópio de resolução 30-80X e microscópio ótico. Os resultados foram apresentados em percentual de ocorrência dos fungos.

EXPERIMENTO DE COINOCULAÇÃO

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura de $30,8 \pm 1,21$ °C durante o dia, e $21,9 \pm 0,95$ °C durante a noite pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, no período de fevereiro a maio de 2018.

Após a caracterização dos lotes de sementes de soja da cultivar M 7110 IPRO, estas foram inoculadas com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, em associação com outros microrganismos benéficos, conforme descrito anteriormente. As sementes foram submetidas ao teste de emergência de plântulas.

PREPARO E ANÁLISE DE SOLO

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor com capacidade de três litros preenchidas com uma mistura de solo e areia (Figura 1). Para isso foi utilizado solo não cultivado, peneirado e não esterilizado na proporção 2:1 com areia também peneirada e não esterilizada. Logo após, uma amostra do substrato foi enviada para análise química, sendo obtidos os seguintes valores: pH em água: 5,2; macronutrientes P: 5,0 mg/dm³, K: 74,0 mg/dm³, Ca²⁺: 2,4 cmol/dm³ e Mg²⁺: 0,6 cmol/dm³; SB: 3,2 cmol/dm³, CTC (t): 3,2 cmol/dm³, CTC (T): 6,0 cmol/dm³, V: 53 % e P-rem: 37,1 mg/L. Já as análises referentes ao alumínio, como acidez trocável (Al³⁺) e saturação por Al³⁺ (m), não foi notado presença. A acidez potencial (H + Al) foi de 2,8 cmol/dm³.



Figura 1. Preparo do substrato e das bandejas para o teste de emergência de plântulas. A - Solo não cultivado, peneirado e não autoclavado, B - areia peneirada e não autoclavada, C - substrato na mistura 2:1 e D - bandejas com capacidade de três litros.

INOCULAÇÃO DAS SEMENTES

As concentrações de células viáveis de cada microrganismo benéfico *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* foram avaliadas nos inoculantes comerciais (Tabela 1). Após a verificação das concentrações de cada inoculante foi realizado a coinoculação nas sementes.

Tabela 1. Concentração de células viáveis de microrganismos benéficos utilizadas no tratamento de coinoculação com *B. japonicum* em sementes de soja cultivar M 7110 IPRO.

Microrganismo benéficos	Meio de cultura	UFC/mL (utilizada na inoculação)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	YMA	8,6 x 10 ⁹
	LGI	8,4 x 10 ⁹
<i>Azospirillum brasilense</i>	BDA	3,5 x 10 ⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	BDA	1,2 x 10 ⁷
<i>Trichoderma asperellum</i>	BDA	1,1 x 10 ¹⁰

UFC - Unidades Formadoras de Colônias, YMA. - *Yeast Malt Agar*, LGI - meio de cultura livre de nitrogênio, BDA - Batata Dextrose Ágar.

As sementes foram tratadas com os inoculantes de acordo com as doses e volumes de calda apresentados na Tabela 2. Os produtos contendo as bactérias *B. japonicum*, *A. brasilense* e *B. subtilis* foram utilizados na dose de 2,0 mL kg⁻¹ de semente. Já a dose do produto contendo o inóculo *T. asperellum* foi de 1 g kg⁻¹ de semente.

Tabela 2. Doses e volumes de calda dos inoculantes utilizados em associação com o *B. japonicum*.

Microrganismos	mL e g / kg de sementes			
	Quantidade	<i>B. japonicum</i> (mL)	Água (mL)	Calda Base (mL)
<i>A. brasilense</i> ^{/1}	2,0 mL	2,0	4,0	8,0
<i>B. subtilis</i> ^{/1}	2,0 mL	2,0	4,0	8,0
<i>T. asperellum</i> ^{/1}	1,0 g	2,0	5,0	8,0
FMA ^{/1}	13 esporos/S	2,0	6,0	8,0
Controle	-	2,0	6,0	8,0

FMA - Fungos micorrízicos arbusculares; controle 1 - somente *B. japonicum*; controle 2 - não tratadas. ^{/1} - Inoculação em conjunto com *B. japonicum*; S - semente de soja.

Após o preparo das caldas bases, as sementes foram tratadas com a adição de alíquotas dos inoculantes às sementes, dentro de sacos de polietileno (Figura 2). As sementes e os inoculantes foram agitados em movimento circular por 1 minuto para garantir cobertura homogênea dos inóculos nas sementes. Afim de evitar a secagem rápida do inoculante e facilitar a fixação dos microrganismos, foi adicionado mais 1,0 mL de água, o que facilitou a distribuição do inoculante por toda a superfície das sementes. As sementes foram semeadas 1 h após a realização do tratamento (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

O substrato contendo os inóculos foi distribuído nas bandejas no momento da semeadura. Assim, a sequência de semeadura foi iniciada com a formação de sulcos, com profundidade 3 a 4 cm, seguido da aplicação do substrato contendo o inóculo homogeneamente distribuído em covas. As sementes previamente inoculadas com *B. japonicum* foram então posicionadas e as covas fechadas (Figura 2). O volume total de inóculo foi de aproximadamente de 360 mL/bandeja ou 13 esporos de FMA/semente.

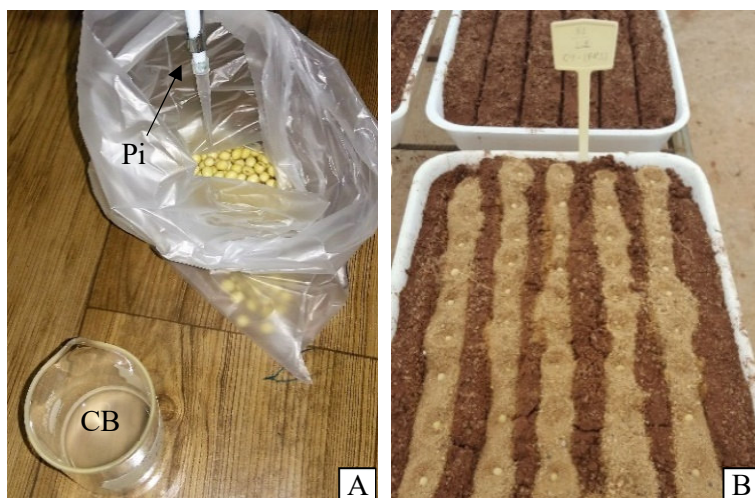


Figura 2. Processo de coinoculação das sementes com *B. japonicum* em associação com microrganismos benéficos. A - Aplicação dos inóculos comerciais, B - aplicação de FMA no substrato em bandejas de emergência, CB - calda base de coinoculação e Pi - pipeta de inoculação.

ANÁLISES DE PLÂNTULAS

A emergência das plântulas foi avaliada diariamente até 15 dias após a data da semeadura (Figura 3). Foram obtidos os seguintes parâmetros: emergência de plântulas, índices de crescimento de plântulas, índice SPAD, análises da morfologia da raiz, matéria seca e comprimento de hipocótilo e radícula.

Emergência de plântulas - foi conduzida em quatro repetições com 50 sementes cada. As bandejas foram preenchidas com substrato de solo e areia na proporção 2:1, respectivamente, previamente umedecido até a capacidade de campo. Após a aplicação dos tratamentos de co-inoculação, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor com capacidade de três litros. As irrigações foram feitas sempre que necessário.

A avaliação do número de plântulas emergidas foi realizada diariamente, e para isso foram consideradas emergidas as plântulas com os cotilédones completamente acima da superfície do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem. Os dados das avaliações diárias foram processados com o pacote SeedCalc do R (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2018), sendo obtidos os seguintes índices de crescimento de plântulas: Tempo médio de emergência (TME), tempo para emergência de 50% de plântulas ($T_{50\%}$), uniformidade de emergência, vigor corrigido e crescimento de plântulas.

Índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) - após a estabilização do número de plântulas emergidas foi avaliado o conteúdo relativo de clorofila das folhas com o equipamento SPAD 502 Plus Chlorophyll Meters (BRAHIM et al., 2017). Para isso, foi obtida a média de três leituras das folhas unifolioladas de plântulas situadas na parte central das bandejas de emergência.

Morfologia da raiz - foram amostradas para as análises dez plântulas de soja retiradas da parte central das bandejas de emergência. As plântulas foram retiradas com a ajuda de água corrente e peneira para evitar perda de raízes. Em seguida, as raízes foram separadas do hipocótilo e conservadas em álcool 40 % para análise no software WinRhizo[®]. Para isso, as raízes das plântulas foram estendidas em uma cuba com dimensões de 30 x 40 cm, já preenchida com 800 mL de água, para aquisição de imagens por *scanner*. A partir das imagens foram obtidos o volume e o comprimento de raiz. Os dados foram expressos em porcentagem de volume e comprimento em classes de diâmetro radicular.

Comprimento de plântulas - foram utilizadas dez plântulas coletadas da parte central de cada bandeja do teste de emergência. As plântulas foram retiradas com o auxílio de água corrente e peneira para evitar perda de raízes. Logo após as plântulas foram

estendidas em um plano para obtenção das imagens com câmera digital. O comprimento das raízes e hipocótilos foram obtidos por meio da análise manual das imagens utilizando-se o software ImageJ® (FERREIRA; RASBAND, 2009). Os resultados foram expressos em centímetros plântula⁻¹.

Matéria seca de plântulas - as plantas foram seccionadas em hipocótilo e raiz e, em seguida, foram colocadas em sacos de papel tipo Kraft para secagem. O material foi mantido em estufa de circulação de ar forçado, por um período de 72 h, a 65 °C. Após a secagem, o material vegetal foi pesado em balança de precisão (0,0001g) para determinação da massa. Os resultados foram expressos em mg plântula⁻¹.



Figura 3. Experimento em casa de vegetação. A - Arranjo de bandejas em blocos, B - Bloco de bandejas após a sementeira, C e D - Bandejas com plântulas de soja emergidas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x 6, ou seja, três níveis de vigor de sementes (alto, médio e baixo) e seis coinoculações, em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma bandeja com cinquenta sementes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e à Análise de Variância. As médias dos dados obtidos para os níveis de vigor de sementes foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os tratamentos de coinoculações foram comparados pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As análises foram efetuadas no software estatístico R, versão 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUALIDADE DAS SEMENTES

Os três lotes de sementes apresentaram diferentes níveis de vigor (Tabela 3). Não houve diferença na porcentagem de germinação, comparando-se os três lotes, porém o lote 1 se destacou como o de maior nível de vigor, apresentando maior porcentagem de emergência e menor valor de condutividade elétrica (CE), comparado aos demais lotes. O lote 2 pode ser classificado como de vigor intermediário, diferindo do lote 1 apenas nos valores de CE, apresentando maior valor, e no comprimento de raiz, apresentando menor valor. Já o lote 3, classificado como o de menor vigor, apresentou menores valores nos testes de emergência, envelhecimento acelerado (EA), índice de velocidade de emergência (IVE), e maior valor de CE.

Portanto, como era esperado, o Lote 1, que não foi submetido ao envelhecimento artificial apresentou melhor desempenho. Já os Lotes 2 e 3, submetidos a 10 e 20 horas de envelhecimento artificial, respectivamente, tiveram o seu vigor reduzido.

Com o envelhecimento artificial as sementes são submetidas a alta temperatura e a elevada umidade relativa. Essas condições em conjunto provocam a deterioração das sementes, ligadas principalmente ao acúmulo nas células de espécies reativas de oxigênio (EROs), como H_2O_2 , O_2^- , OH^- . O acúmulo das EROs desencadeia uma série de processos degenerativos causando lesões celulares e provocando redução da qualidade fisiológica das sementes. Os principais danos são: a peroxidação de lipídeos, perda da viabilidade das membranas, perda da viabilidade das mitocôndrias, danos ao DNA, redução de ATP, perda da compartimentalização celular, e desbalanço metabólico (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004; JEEVAN KUMAR et al., 2015). Em decorrência deste processo e do acúmulo de danos, ocorre a redução da qualidade das sementes, associado ao aumento nos valores de C.E., conforme observado para os Lotes 2 e 3.

É importante destacar, porém, que os três lotes utilizados para o estudo apresentaram elevada qualidade fisiológica. A porcentagem de germinação e emergência de plântulas foram maiores que 95 %, para os três lotes. Assim, apesar da diferença de vigor observada, os três lotes atendem aos padrões para comercialização de sementes de soja exigidos pela legislação (BRASIL, 2013).

Ainda, no teste de sanidade para o lote matriz, foram observados apenas o fungo patogênico *Macrophomina phaseolina*, além da presença de contaminantes ou saprófitos, como bactérias e *Cladosporium spp*, em todos os casos com infecção menor que 1 %.

Tabela 3. Umidade, germinação e testes de vigor em lotes de sementes de soja submetidas ao envelhecimento artificial por zero, 10 e 20 horas.

Avaliação	Lotes			CV (%)
	1	2	3	
Umidade (%)	11,4 a	11,5 a	10,8 a	1,67
Germinação (%)	96 a	93 a	92 a	4,26
Primeira contagem (%)	95 a	91 a	90 a	4,03
Emergência (%)	95 a	90 ab	75 b	9,49
Envelhecimento (%)	78 a	73 a	45 b	9,47
IVE (unidade)	11,9 a	11,4 a	9,3 b	7,50
CE ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$)	88,5 c	110,6 b	129,2 a	8,36
Matéria seca H (mg)	1633,3 a	1662,9 a	1741,4 a	4,58
Matéria seca RA (mg)	438,3 a	412,5 a	449,1 a	8,12
Comprimento H (cm)	18,13 a	18,81 a	17,67 a	3,96
Comprimento RA (cm)	22,60 ab	20,58 b	23,68 a	5,35

CV - Coeficiente de variação, IVE - índice de velocidade de emergência, CE - condutividade elétrica, H - hipocótilo e RA - radícula. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferiram entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS

Para a maioria dos parâmetros avaliados, a interação entre os fatores, vigor de sementes e microrganismos benéficos, foram não significativas, com exceção do TME e $T_{50\%}$ (Tabela 4). Apesar da baixa interação entre os níveis de vigor e as coinoculações, foi possível identificar que para a maioria dos testes, os fatores individuais apresentaram diferenças significativas (Tabela 4).

Para o vigor de sementes foi possível identificar diferenças na porcentagem de emergência, no índice de velocidade de emergência e comprimento do hipocótilo. Além dessas alterações o índice de vigor corrigido e a uniformidade de emergência das plântulas também foram comprometidas com a metodologia do envelhecimento acelerado.

Resultados similares também foram encontrados por SANTOS; MENEZES; VILLELA (2004), ao aplicar o envelhecimento artificial em sementes de feijão. O envelhecimento artificial foi aplicado por zero, 24, 48, 72 e 96 horas e afetou o comprimento do hipocótilo, radícula e a primeira contagem de germinação, teste similar ao índice de velocidade de emergência de plântulas.

De maneira similar, as coinoculações também alteraram o desenvolvimento das plântulas em seu estágio inicial de desenvolvimento, com destaque para o comprimento e o índice de crescimento das plântulas. Estes resultados estão relacionados à atuação dos microrganismos utilizados neste experimento, que possuem mecanismos de ação capazes de promover o crescimento das plântulas. Por exemplo, a produção de fitohormônios (FUKAMI et al., 2017), solubilização de fósforo inorgânico (PARRAY et al., 2016), aumento do fluxo nutrientes como N, K, Mg, Cu e Zn e disponibilidade água (NADEEM et al., 2014).

Plântulas originadas de sementes de médio e baixo vigor apresentaram menor crescimento, comparadas às plântulas oriundas de sementes de alto vigor (Tabela 5). Em geral, os maiores valores de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, comprimento do hipocótilo, vigor corrigido e uniformidade das plântulas foram obtidas para o lote de alto vigor, seguido pelo de vigor intermediário e o de baixo vigor. Por outro lado, os parâmetros como a matéria seca, comprimento radicular, índice SPAD e crescimentos não foram afetados pelos níveis de vigor das sementes.

Tabela 4. Resumo da análise de variância dos dados obtidos com a avaliação de plântulas oriundas de sementes tratadas com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Avaliação	Fonte de variação				CV (%)
	Bloco	V	C	V*C	
Emergência	*	*	ns	ns	7,97
IVE	*	*	ns	ns	8,32
Comprimento H	ns	*	*	ns	5,51
Comprimento Ra	ns	ns	*	ns	9,43
Matéria seca H	*	ns	ns	ns	9,17
Matéria seca Ra	*	ns	ns	ns	11,25
Índice SPAD	ns	ns	ns	ns	4,98
Crescimento	ns	ns	*	ns	8,92
Vigor corrigido	ns	*	*	ns	7,47
Uniformidade	ns	*	ns	ns	1,5
T _{50%}	*	-	-	*	1,1
TME	*	-	-	*	2,17

V - Vigor, C - coinoculação, CV - coeficiente de variação, IVE - índice de velocidade de emergência, CE - condutividade elétrica, E - emergência, H - hipocótilo, RA - radícula, T_{50%} - tempo para emergência de 50 % de plântulas e TME - tempo médio de emergência. * - significativo e ns - não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Assim, os Lotes 2 e 3, classificados como de vigor intermediário e de baixo vigor, apresentaram menor emergência, uniformidade de emergência e crescimento de plântulas (Tabela 5). Diferenças nos tempos para germinação das sementes ou emergência de plântulas caracteriza diferenças no vigor das sementes (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Em geral, lotes de sementes com alto vigor, apresentam germinação rápida e uniforme, como observado para o Lote 1 no presente trabalho. Assim, o baixo vigor das sementes pode comprometer a emergência e o crescimento das plântulas, o que pode impactar diretamente o estabelecimento da cultura da soja (CANTARELI et al., 2015), e consequentemente pode afetar a produtividade (SCHUCH; KOLCHINSK; FINATTO, 2009).

Com relação às coinoculações com microrganismos benéficos, sementes inoculadas com FMA desenvolveram plântulas maiores e com ligeira vantagem no índice de crescimento em relação aos controles adotados (Tabela 6), sendo que este tratamento diferiu dos controles, sementes tratadas apenas com *B. japonicum* ou sementes não tratadas, em relação à comprimento de hipocótilo, comprimento de raiz, além do índice

de crescimento e vigor corrigido. Estes dois últimos parâmetros levam em consideração o crescimento e a uniformidade de crescimento das plântulas (SAKO et al., 2001).

Assim, foi observado maior crescimento das plântulas oriundas de sementes coinoculadas com FMA (Tabela 6). As principais estruturas destes microrganismos em associação com as raízes são os arbúsculos, hifas, vesículas e esporos que são capazes de promover o crescimento das plantas através de vários mecanismos de ação (BIANCOTTO; BONFANTE, 2002; MIRANSARI et al., 2009). Essas estruturas ajudam as raízes das plantas a elevar o aporte de nutrientes como o fósforo e o fluxo de água, além de ajudar na estruturação do solo (MEENA et al., 2018). Também é importante destacar que a variação genética intraespecífica entre os FMA é fundamental, já que esta variação potencializa os aspectos positivos deste tipo de associação (HEIJDEN; WIEMKEN; SANDERS, 2003). Dessa maneira, o maior aporte de água e nutrientes podem ter exercido papel determinante para o crescimento das plântulas de soja já nos primeiros quinze dias de desenvolvimento.

Independentemente do nível de vigor das sementes, a coinoculação com FMA contribuiu para o aumento no crescimento inicial de plântulas de soja (Tabela 6). Esse resultado também comprova a capacidade que esses FMA têm em amenizar sintomas de estresse na planta. De acordo com NADEEM et al. (2014), a associação entre FMA e planta pode elevar ainda mais o poder antioxidativo. Esse sistema é de extrema importância para as plântulas provindas de sementes de baixo vigor, porque reduz as espécies reativas de oxigênio acumuladas durante o estresse do armazenamento e do plantio em campo (JEEVAN KUMAR et al., 2015).

Vale ressaltar que nenhuma coinoculação resultou em redução ou desvantagem no crescimento das plântulas de soja (Tabela 6). Existem relatos de que a inoculação de mais de um microrganismo nas sementes pode gerar grande sinergia, aumentando assim o desenvolvimento e produtividade de várias culturas (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015; JESUS et al., 2018). Contudo, fatores como altas doses de inoculantes, incompatibilidade com pesticidas, fertilizantes, tratamentos de semente, espécies de plantas, microrganismos e o tipo de solo podem levar a resultados negativos ao crescimento das plantas (ZILLI et al., 2010; FUKAMI et al., 2017). Assim, estes fatores devem ser considerados no momento da inoculação dos microrganismos benéficos.

Tabela 5. Emergência e índices de crescimento de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.

Avaliação	Vigor		
	Alto	Médio	Baixo
Emergência	94 a	88 b	78 c
CV (%)	7,97		
	(Unidade)		
IVE	11,85 a	10,82 b	9,36 c
CV (%)	8,32		
	(cm)		
Comprimento H	18,89 a	18,89 a	18,15 b
CV (%)	5,51		
	(cm)		
Comprimento RA	22,47 a	23,27 a	22,60 a
CV (%)	9,43		
	(mg)		
Matéria seca H	1.671,6 a	1.726,2 a	1.751,5 a
CV (%)	9,17		
	(mg)		
Matéria seca RA	423,5 a	433,4 a	434,8 a
CV (%)	11,25		
	(Unidade)		
SPAD	36,0 a	35,9 a	35,6 a
CV (%)	4,98		
	(Unidade)		
Crescimento	2.211,0 a	2.283,2 a	2.211,6 a
CV (%)	8,92		
	(Unidade)		
Vigor corrigido	1.704,2 a	1.631,0 a	1.387,1 b
CV (%)	7,47		
	(Unidade)		
Uniformidade	969,5 a	963,8 ab	958,7 b
CV (%)	1,5		

CV - Coeficiente de variação, IVE - índice de velocidade de emergência, H – hipocótilo e RA - radícula. Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6. Emergência e índices de crescimento de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes inoculadas com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Avaliação	Coinoculação					
	A + B	Ba + B	T + B	FMA + B	C1	C2
Emer.	85	85	84	90	86	87
IVE	10,5	10,5	10,4	11,0	10,8	10,8
CH	18,5	18,2	18,1	19,8 ^{C2}	19,1	18,2
CRA	22,1	21,3	23,1	25,2 ^{C1 e C2}	22,7	22,3
MSH	1.707,9	1.679,0	1.692,7	1.767,7	1.772,1	1.679,2
MSRA	428,5	417,9	422,0	443,4	438,3	433,3
SPAD	35,8	35,6	36,3	35,1	35,8	36,3
Cres.	2.174,9	2.103,1	2.256,3	2.462,3 ^{C1 e C2}	2230,6	2184,6
VC	1.510,1	1.482,6	1.550,2	1.776,6 ^{C1 e C2}	1574,0	1550,9
Unif.	964,2	969,0	961,1	957,3	965,2	967,1

A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares, B - *Bradyrhizobium japonicum*, C1 - controle 1, somente B e C2 - controle 2, sem inoculação. CV - coeficiente de variação, Emer. - emergência de plântulas, IVE - índice de velocidade de emergência, CH - comprimento hipocótilo, CRA - comprimento radícula, MSH - matéria seca hipocótilo, MSRA - matéria seca radícula, Cres. - crescimento, VC - vigor corrigido e Unif. - uniformidade. ^{C1} - significativo em relação ao controle 1 e ^{C2} - significativo em relação ao controle 2 a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Para os parâmetros T_{50%} e TME de plântulas foram observadas interações significativas entre as coinoculações com microrganismos benéficos e os diferentes níveis de vigor das sementes, no qual foram desdobrados na seguinte tabela (Tabela 7).

Tabela 7. Tempo para 50 % de emergência de plântulas (T_{50%}) e tempo médio de emergência de plântulas (TME) de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Coinoculação	Vigor		
	Alto	Médio	Baixo
	T _{50%} (dias)		
A + B	3,47 b	3,53 ab	3,59 a ^{C1}
Ba + B	3,52 a ^{C2}	3,51 a	3,55 a
T + B	3,52 b ^{C2}	3,49 b	3,61 a ^{C1}
FMA + B	3,49 b	3,56 a	3,60 a ^{C1}
Controle 1	3,44 b	3,56 a	3,50 ab
Controle 2	3,46 b	3,53 a	3,58 a
	TME (dias)		
A + B	3,95 b	4,11 a	4,20 a ^{C1}
Ba + B	4,06 b	4,04 b	4,23 a ^{C1}
T + B	4,08 a ^{C2}	4,08 a	4,11 a
FMA + B	3,99 b	4,20 a	4,18 a
Controle 1	3,94 b	4,19 a	4,02 b
Controle 2	3,94 b	4,08 ab	4,17 a

A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares e B - *Bradyrhizobium japonicum*, controle 1 - somente B e controle 2 - sem inoculação. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey; ^{C1} - significativo em relação ao controle 1 e ^{C2} - significativo em relação ao controle 2 a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnett.

O T_{50%} e o TME de emergência foram menores para plântulas provenientes de sementes mais vigorosas (Tabela 7), ou seja, a emergência das plântulas se deu de forma mais rápida para as sementes de alto vigor, já que estes parâmetros estão ligados ao tempo necessário para ocorrer a emergência das plântulas. Esse comportamento é característico de lotes de sementes com alto vigor (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Entretanto, para as coinoculações com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum*, T_{50%} e TME, respectivamente, não diferiram comparando-se os três níveis de vigor. Estes resultados podem estar ligados à produção de hormônios pelos

microrganismos, que contribuíram para o aumento na velocidade de emergência dos lotes de sementes de baixo vigor.

Segundo ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA (2005), estirpes de *B. subtilis* AP-3 e PRBS-1 inoculadas com *B. japonicum* demonstraram potencial no controle biológico de fungos patogênicos da soja e na promoção do crescimento radicular, a partir da produção de fitohormônios. Além disso, podemos destacar o processo de sinergia da coinoculação para o *B. japonicum*, que também tem capacidade de produzir fitohormônios (auxina, giberilina, citocinina, etileno e ácido abscísico), além da fixação do nitrogênio atmosférico (BOIERO et al., 2007). Ainda, o microrganismo *T. asperellum*, que também tem ação promotora de crescimento radicular e grande importância no controle biológico de doenças e fungos patogênicos (HARMAN, 2006), pode ter contribuído para este resultado.

Por outro lado, foi observado retardamento da emergência ou do crescimento de plântulas provenientes de sementes mais vigorosas, quando estas foram coinoculadas com o *B. subtilis*, maior $T_{50\%}$, e *T. asperellum*, maior TME. Segundo, Pérez-Montaña et al. (2014), as plântulas dividem os metabólitos com os microrganismos no processo de simbiose. Assim, isto pode ter levado ao atraso na emergência das plântulas oriundas de sementes que receberam estes tratamentos. Além disso, existe a possibilidade de plântulas provenientes de sementes menos vigorosas terem se beneficiado com o rápido crescimento dos microrganismos no início do processo de germinação/emergência, já que estas sementes podem ter liberado mais exsudados que as sementes mais vigorosas no momento do processo de embebição, como açúcares, ácidos orgânicos, mucilagem e proteínas, conforme valores obtidos no teste de C.E. (Tabela 3). Este mecanismo pode ter facilitado o processo simbiótico com as plântulas de soja, sendo que de acordo com Jacoby et al. (2017), o alto volume de exsudatos, importante sinal de atração e recurso para o crescimento de microrganismos na rizosfera, poderia impactar o comportamento dos microrganismos em associação. Vale lembrar que esses exsudatos podem atrair tanto microrganismos benéficos como patogênicos.

Observa-se, em geral, maior $T_{50\%}$ e TME para as sementes que receberam tratamentos de coinoculação, tanto para o lote de sementes com alto vigor, quanto para o lote de sementes com baixo vigor (Tabela 7). Apesar do aumento significativo no tempo de emergência, as coinoculações não afetaram o estabelecimento das plântulas após os quinze dias de desenvolvimento, conforme observado para os dados de crescimento de plântulas (Tabela 4 e 6).

O comprimento radicular, analisado em diferentes classes de diâmetros, não foi influenciado pelos tratamentos de coinoculações e nem pelos níveis de vigor das sementes utilizadas neste trabalho (Tabela 8), com exceção somente das raízes com diâmetro entre 2,0 a 2,5 mm, para as quais foi obtida interação significativa. Contudo, o alto valor do coeficiente de variação sugere que os dados têm baixa precisão. Por outro lado, o volume radicular foi afetado tanto pelos níveis de vigor quanto pelas coinoculações, principalmente para as raízes mais finas (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância para os dados de comprimento e volume de raízes de plântulas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

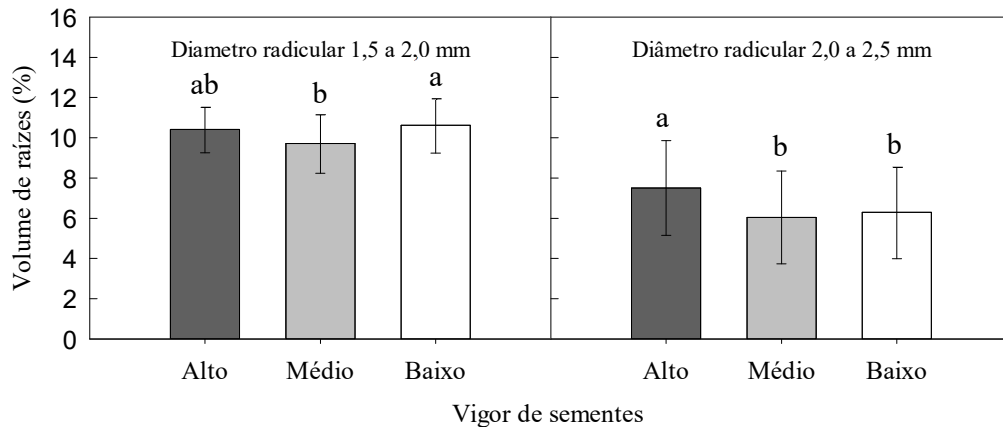
Classe de diâmetro	Comprimento (C)				Volume (Vol)			
	V	C	V*C	CV (%)	V	C	V*C	CV (%)
0<D≤0,5	ns	ns	ns	2,70	ns	ns	ns	9,57
0,5<D≤1,0	ns	ns	ns	6,25	ns	*	ns	5,88
1,0<D≤1,5	ns	ns	ns	10,41	-	-	*	6,54
1,5<D≤2,0	ns	ns	ns	26,35	*	*	ns	11,2
2,0<D≤2,5	-	-	*	138,05	*	ns	ns	22,42
2,5<D≤3,0	ns	ns	ns	-	ns	*	ns	15,02
3,0<D≤3,5	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	33,55
3,5<D≤4,0	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	51,33
4,0<D≤4,5	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	112,72
D>4,5	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	170,61

V - Vigor, C - coinoculação, CV - coeficiente de variação. * - significativo e ns - não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F.

Maiores volumes de raiz foram observados em plântulas oriundas de sementes de alto e baixo vigor, no diâmetro de 1,5 a 2,0 mm, e de alto vigor, no diâmetro de 2,0 a 2,5 mm (Figura 4). O maior vigor das sementes, em geral, contribui para a formação de plântulas mais vigorosas e com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos (CAVERZAN et al., 2018). Porém, o maior volume de raízes de plântulas oriundas de sementes com baixo vigor, no diâmetro de 1,5 a 2,0 mm, pode estar relacionado ao maior crescimento da raiz em detrimento da parte aérea das plântulas, já que estas plântulas apresentaram menor comprimento de hipocótilo (Tabela 5). Hipotetiza-se que esta seja

uma estratégia das sementes de vigor reduzido a fim de aumentar a absorção de água e nutrientes, já que as reservas da semente poderiam estar limitadas.

Figura 4. Volume de raízes de plântulas de soja cv M 7110 oriundas de diferentes diâmetros de raízes e níveis de vigor de sementes.



Letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Foi observada redução do volume radicular, das raízes com diâmetro de 1,5 a 2,0 mm, das plântulas oriundas de sementes coinoculadas com os microrganismos *T. asperellum* ou FMA (Figura 5). Já para as raízes com 2,5 a 3,0 mm de diâmetro, foi observado aumento significativo em plântulas cuja as sementes foram coinoculadas com FMA. Esses dados estão de acordo com os observados para o comprimento (Tabela 6), sendo que os FMA em associação com *B. japonicum* contribuiu para a promoção do crescimento radicular.

As coinoculações com microrganismos adotados nesse trabalho possuem mecanismos de ação capazes de alterar a estrutura morfológica e promover o crescimento das raízes alterando os estímulos hormonais da planta, controlando ou competindo com microrganismos patogênicos e aumentando o aporte de água e nutrientes para as plantas (JACOBY et al., 2017; MEENA et al., 2018; LÜ; ZOU; WU, 2018). Portanto, estes mecanismos de ação podem ter contribuído para o maior crescimento das raízes de plântulas de soja coinoculadas com FMA, porém estes mecanismos ainda precisam ser melhor entendidos na cultura da soja.

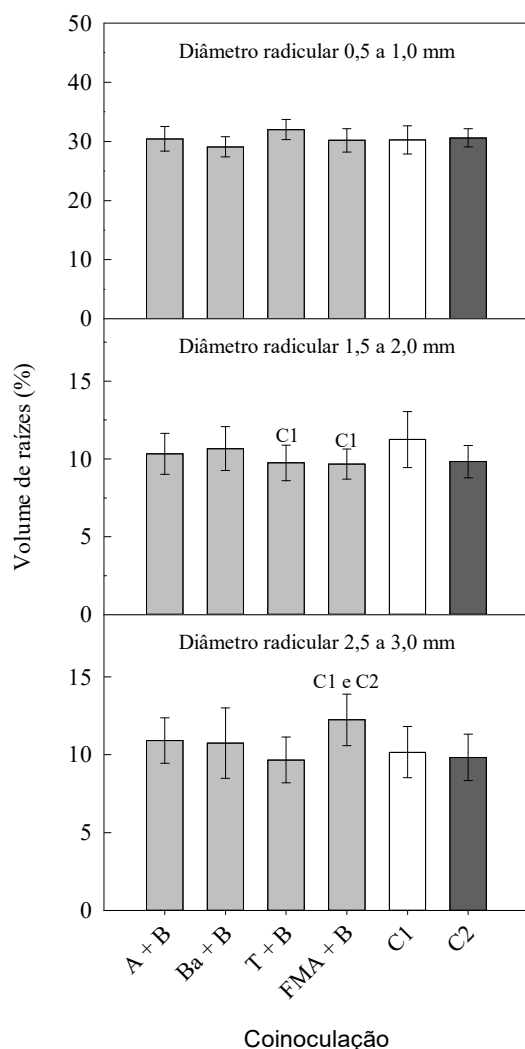


Figura 5. Volume de raízes de plântulas de soja cv M 7110 oriundas de diferentes diâmetros de raízes e coinoculações de microrganismos benéficos em sementes.

A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares, B - *Bradyrhizobium japonicum*, C1 - controle 1, somente B e C2 - controle 2, sem inoculação.

C¹ - significativo em relação ao controle 1 e C² - significativo em relação ao controle 2 a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Para as raízes com 1,0 a 1,5 mm de diâmetro foi observada interação significativa entre os níveis de vigor e os microrganismos benéficos (Tabela 8). De modo geral, os controles demonstraram uma leve tendência de redução do volume radicular em função da perda de vigor das sementes (Tabela 9). De maneira oposta, todas as coinoculações contribuíram para que o volume radicular das sementes de baixo vigor se assemelhasse ao das plântulas oriundas de sementes de alto vigor.

Esse fato sugere que o desenvolvimento de raízes com diâmetro de 1,0 a 1,5 mm podem ser estimuladas a se desenvolver por microrganismos benéficos avaliados nesse estudo. Isto pode ser vantajoso, já que são as raízes mais finas as grandes responsáveis por explorar maiores volumes de solo, formar pontos de nodulação e absorver água e nutriente para o desenvolvimento das plantas (MACHACULEHA CHIBEBA et al., 2015). Além do mais, raízes nesse calibre podem conferir ótima vantagem aos FMA, porque são nas raízes mais finas que são encontradas a maior parte das estruturas fúngicas

dessa espécie, que são responsáveis pela promoção de crescimento de plântulas (BIANCIOTTO; BONFANTE, 2002).

Tabela 9. Volume de raízes com diâmetro de 1,0 a 1,5 mm de plântulas de soja cv M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Coinoculação	Vigor		
	Alto	Médio	Baixo
Volume radicular 1,0<D≤1,5			
A + B	20,25 a	20,25 a ^{C1}	19 a ^{C2}
Ba + B	19,50 a	20,75 a ^{C1}	20,25 a
T + B	19 a	19,75 a ^{C1}	20,50 a
FMA + B	21 a	20 a ^{C1}	19,25 a
Controle 1	20,75 a	17,75 b	19,75 ab
Controle 2	20,25 ab	18,75 b	21,25 a

A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares e B - *Bradyrhizobium japonicum* D - diâmetro. controle 1 - somente *Bradyrhizobium japonicum* e controle 2 - sem inoculação. Médias seguida por letras iguais na linha, não diferiram entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. ^{C1} - significativo em relação ao controle 1 e ^{C2} - significativo em relação ao controle 2 a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnett.

O desenvolvimento radicular das plântulas provenientes de sementes coinoculadas, em geral, foi maior comparado ao tratamento apenas com o *B. japonicum* (Controle 1) (Tabela 9). Já as plântulas provenientes de sementes de baixo vigor não demonstraram diferenças de desenvolvimento radicular na maioria das inoculações, com exceção da inoculação com *A. brasilense*.

A inoculação com *A. brasilense* pode estimular ou inibir o desenvolvimento radicular. Isso vai depender das concentrações desse microrganismo no momento da inoculação. A razão pode ser indicada pela alta produção do fitohormônio auxina, que além de promover pode também inibir o enraizamento, o que depende da concentração do hormônio na rizosfera, com consequente aumento do peso radicular (MASCIARELLI; LLANES; LUNA, 2014).

Em síntese na maioria dos parâmetros avaliados não foi observado relação entre os fatores vigor de sementes e microrganismos benéficos, exceto para TME e T_{50%}. Contudo, cada fator, individualmente, demonstrou forte influência sob o crescimento das plântulas de soja. Para o vigor foi confirmado o pressuposto de que lotes de sementes com alto vigor, apresentam germinação rápida e uniforme. Já sementes de baixo vigor podem comprometer a emergência e o crescimento das plântulas. Quanto às coinoculações, destaca-se os FMA, uma vez que essa coinoculação apresentou plântulas maiores e com ligeira vantagem no índice de crescimento em relação aos controles adotados.

Em relação aos parâmetros T_{50%} e TME de plântulas, foram observadas interações significativas entre as coinoculações e os diferentes níveis de vigor. Estes parâmetros evidenciaram que plântulas provenientes de sementes mais vigorosas levam menos tempo para emergir. Entretanto, para as coinoculações com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* observa-se, em geral, maior T_{50%} e TME para as sementes que receberam tratamentos de coinoculação, tanto para o lote de sementes com alto vigor, quanto para o lote de sementes com baixo vigor. Apesar do aumento significativo no tempo de emergência, as coinoculações não afetaram o estabelecimento das plântulas após os quinze dias de desenvolvimento.

Para as análises radiculares, não foi observado alterações no comprimento das raízes, enquanto houve alterações no volume radicular. Os maiores volumes de raízes com 1,5 a 2,0 mm de diâmetro foram observadas em plântulas oriundas de sementes de alto e baixo vigor. Já maior volumes de raízes com 2,0 a 2,5 mm de diâmetro foram observadas em plântulas oriundas de sementes de alto vigor. Considerando somente a coinoculação, o volume de raízes com 2,5 a 3,0 mm de diâmetro teve aumento significativo nas plântulas oriundas de sementes coinoculadas com FMA. Esse resultado demonstra mais uma vez a capacidade dos FMA em promover o crescimento de plântulas de soja.

Em destaque, o volume de raízes com 1,0 a 1,5 mm de diâmetro apresentaram interação significativa entre os fatores, vigor e coinoculação. Nesse diâmetro, observou-se uma leve tendência em reduzir o volume radicular em função do menor vigor das sementes. Por outro lado, todas as coinoculações contribuíram para que o volume radicular, de raízes com esse diâmetro, em plântulas oriundas de sementes de baixo vigor se assemelhasse ao das plântulas oriundas de sementes de alto vigor.

Apesar do vigor reduzido das sementes ser um fator determinante para o baixo desenvolvimento de plântulas de soja (SCHEEREN et al., 2010), a coinoculação dessas

sementes pode contribuir para amenizar os efeitos negativos da baixa qualidade das sementes no estágio inicial de desenvolvimento das plântulas.

CONCLUSÕES

1. A inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium* em associação com os microrganismos benéficos *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) contribuem para maior velocidade de emergência e maior crescimento de plântulas de soja, independentemente do vigor das sementes.
2. Os FMA apresentam elevado potencial para serem indicados para o tratamento de sementes de soja, visando maior crescimento da plântula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOL, A. D.; HIRAKURI, M. H. Circular Técnica 59: Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja. **EMBRAPA**, v. 59, p. 8, 2008.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BIANCIOTTO, V.; BONFANTE, P. Arbuscular mycorrhizal fungi: A specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1–4, p. 365–371, 2002.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 4, p. 407–415, 1997.

BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.

BRAHIM, S. et al. Effect of combined fertilization with rock phosphate and elemental sulphur on yield and nutrient uptake of soybean. **Plant, Soil and Environment**, v. 63, n. 2, p. 89–95, 2017.

BRASIL. **Regras para análise de semente**. Primeira ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009a.

BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes, Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras Para Análise de Sementes**. Primeira ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009b.

BRASIL. **Instrução normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010 alterada**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

BRASIL. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013**. Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2018.

CAMPO & NEGÓCIOS. **Sementes piratas invadem lavouras brasileiras**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2016/01/Matéria-Sementes-piratas-invadem-lavouras-brasileiras0001.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

CANTARELI, L. D. et al. Variabilidade de plantas de soja originadas de sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Acta Agronômica**, v. 64, n. 3, p. 234–238, 2015.

CAVERZAN, A. et al. How does seed vigor affect soybean yield components? **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1318–1327, 2018.

CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira. grãos, v.12 Safra 2017/18** - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-148, setembro 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 20 Set. 2018.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **The ImageJ User Guide 1.44**. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2018.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.

FUKAMI, J. et al. 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, 2017.

GALINDO, F. S. et al. 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, n. 1, p. 51–56, 2018.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HEIJDEN, M. G. A. VAN DER; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plants. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 569–578, 2003.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

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, n. 7, p. 791–801, 2013.

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.

JACOBY, R. et al. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–19, 2017.

JEEVAN KUMAR, S. P. et al. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.

JESUS, E. DA C. et al. Co-inoculation of *Bradyrhizobium stimulates* the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. **Plant and Soil**, v. 425, n. 1–2, p. 201–215, 2018.

LOPES, M. A. **A era dos insumos biológicos: como a biotecnologia é importante.** Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2018/08/era-dos-insumos-biologicos-como-biotecnologia-e-importante.html>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 109–123, 2015.

LÜ, L.; ZOU, Y.; WU, Q. Relationship between arbuscular mycorrhizas and plant growth: improvement or depression? In: GIRI, B.; PRASAD, R.; VARMA, A. (Eds.). **Root Biology. Soil Biology**. 1. ed. Jingzhou, Hubei, China: [s.n.]. v. 52p. 451–464.

MACHACULEHA CHIBEBE, A. et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 10, p. 1641–1649, 2015.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. DE B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015.

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7–8, p. 609–615, 2014.

MEENA, R. S. et al. Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 207–223, 2018.

MIRANSARI, M. et al. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. **Soil and Tillage Research**, v. 103, n. 2, p. 282–290, 2009.

NADEEM, S. M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria

(PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 429–448, 2014.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; NETO, J. DE B. F. (Eds.). **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

OLIVI, J. B.; PIMENTA, I. **Mato Grosso quer plantar sementes próprias na 1ª quinzena de fevereiro**. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/videos/soja/227035-mato-grosso-quer-plantar-sementes-proprias-na-1-quinzena-de-fevereiro.html#.XD_cMVxKjIU>. Acesso em: 16 jan. 2019.

PARK, Y. G. et al. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–28, 2017.

PARRAY, J. A. et al. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 877–902, 2016.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5–6, p. 325–336, 2014.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Áustria. R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SÁ, H. S.; AZEVEDO, D. B. **Pirataria de sementes: influências e riscos para o agronegócio brasileiro**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Pirataria-de-Sementes-influências-e-riscos-para-o-agronegócio-brasileiro.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SAKO, Y. et al. A system for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 625–636, 2001.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. DE; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110–119, 2004.

SCHEEREN, B. R. et al. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 035–041, 2010.

SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSK, E. M.; FINATTO, J. A. Qualidade fisiológica da semente e desempenho de plantas isoladas em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 144–149, 2009.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: UFV, 2015.

SILVA, L. J. DA; MEDEIROS, A. D. DE; OLIVEIRA, A. M. S. **Seed Germination and Seedling Growth Indexes**. Viçosa, MGCRAN.R., 2018. Disponível em: <<https://cran.r->

project.org/web/packages/SeedCalc/index.html> Acesso em: 17 jan. 2019.

SOARES, M. M. et al. Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 4, p. 370–378, 2015.

SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 3, p. 327–332, 2015.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. DE B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

VIEIRA, F. C. F. et al. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por Peg 6000. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 543–552, 2013.

ZILLI, J. É. et al. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1875–1881, 2010.

Capítulo II

DESEMPENHO VEGETATIVO E PRODUTIVO DE PLANTAS DE SOJA ORIGINADAS DE SEMENTES COINOCULADAS COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS E DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR.

RESUMO - A produção da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pode ser influenciada pela qualidade das sementes. Além disso, o desenvolvimento das plantas ainda pode ser desuniforme. Neste sentido, destaca-se a utilização de microrganismos benéficos. Eles podem promover o crescimento das plantas alterando os estímulos hormonais, controlando ou competindo com microrganismos patogênicos, aliviando sintomas de estresse, aumentando o aporte de água e nutrientes para as plantas através de vários mecanismos de ação. No entanto, ainda não há estudos que avaliam os efeitos da coinoculação com microrganismos benéficos em sementes de baixa qualidade fisiológica sobre o crescimento e a produtividade das plantas de soja. Diante disso, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos principais microrganismos benéficos em coinoculação em sementes de soja com diferentes níveis de vigor no crescimento das plantas e na produtividade. Sementes de soja, cultivar M 7110 IPRO, produzidas na safra 2016/2017, foram submetidas ao envelhecimento artificial para a obtenção de três níveis de vigor: alto, médio e baixo. Foi realizada a coinoculação das sementes com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, associada com os microrganismos benéficos: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições. Foi utilizado o esquema fatorial 3 x 5, ou seja, três níveis de vigor das sementes e quatro inoculações mais um controle, que consistiu nas sementes inoculadas apenas com o *B. japonicum*. Foram avaliados parâmetros de crescimento e produtividade no estágio de floração plena (estádio vegetativo) e colheita (estádio produtivo): índice SPAD, número de folhas trifolioladas, área foliar, matéria seca de plantas, nitrogênio total em folhas, número de nódulos, matéria seca de nódulos, colonização micorrízica, número de vagens, número de sementes por planta, peso de 100 sementes e tamanho de sementes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey, para os níveis de vigor das sementes, e Dunnett, para as coinoculações ($p \leq 0,05$). A coinoculação de FMA com *B. japonicum* aumentou a taxa de crescimento vegetativo das plantas de soja quando

comparado com o controle. Além disso, a variação do vigor de sementes levou à desuniformidade das características de produção, como o número, o peso e o tamanho de semente por planta. No entanto, essa desuniformidade foi amenizada por meio das coinoculações dos microrganismos benéficos FMA, *A. brasilense* e *B. subtilis* com *B. japonicum*. Diante disso, as coinoculações podem estimular o crescimento vegetativo e uniformizar as características de produção de plantas de soja originadas de sementes em diferentes níveis de vigor.

Palavras chaves: Uniformidade de planta, qualidade de sementes, crescimento vegetativo, inoculação, *Bradyrhizobium japonicum*.

Chapter II

VEGETATIVE AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF SOYBEAN PLANTS ORIGINATED FROM SEEDS CO-INOCULATED WITH BENEFICIAL MICROORGANISMS AND DIFFERENT LEVELS OF VIGOR.

ABSTRACT - The production of the soybean crop (*Glycine max* (L.) Merrill) can be influenced by the quality of the seeds. Moreover, the plant development may also be non-uniform. In this way, stands out the use of beneficial microorganisms. They can promote plant growth by altering hormonal stimulus, controlling or competing with pathogenic microorganisms, relieving stress symptoms, increasing the supply of water and nutrients to plants through several mechanisms of action. However, there are no studies that evaluate the effects of co-inoculation with beneficial microorganisms on seeds of low physiological quality on the growth and productivity of soybean plants. Hence, the objective of this study was to evaluate the effects of the main beneficial microorganisms on co-inoculation in soybean seeds with different levels of vigor in plant growth and productivity. Soybean seeds, cultivar M 7110 IPRO, produced in the 2016/2017 growing season, were submitted to artificial aging to obtain three levels of vigor: high, medium and low. The seeds were co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, associated with beneficial microorganisms: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The experiment was conducted in a greenhouse in a randomized complete block design with four replicates. A 3 x 5 factorial scheme was used, i.e., three levels of seed vigor and four co-inoculations plus one control, which consisted of seeds inoculated only with *B. japonicum*. Growth and productivity parameters were evaluated at the full flowering stage (vegetative stage) and harvest (productive stage), respectively: SPAD index, number of trifoliolate leaves, leaf area, dry matter of plants, total nitrogen in leaves, number of nodules, dry matter of nodules, mycorrhizal colonization, number of pods, number of seeds per plant, weight of 100 seeds and seed size. The data obtained were subjected to the Shapiro-Wilk normality test and to Analysis of Variance. The means of the treatments were compared by the Tukey test, for the seed vigor, and Dunnett test, for the co-inoculations ($p \leq 0.05$). AMF co-inoculation with *B. japonicum* increased the rate of vegetative growth of soybean plants when compared to control. In addition, seed vigor variation led to lack of uniformity of production characteristics such as seed number, weight and seed size per plant. However, this no-uniformity was mitigated through co-

inoculations of the beneficial microorganisms AMF, *A. brasilense* and *B. subtilis* with *B. japonicum*. Therefore, co-inoculation can stimulate vegetative growth and standardize production characteristics of soybean plants originated from seeds with different levels of vigor.

Keywords: Plant uniformity, seed quality, vegetative growth, inoculation, *Bradyrhizobium japonicum*.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa papel de destaque na aplicação de microrganismos benéficos no setor agrário, principalmente com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico. Para se ter uma ideia, cerca de 90 % dos solos brasileiros plantados com soja nas últimas décadas foram inoculados com microrganismos benéficos do gênero *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* (FERREIRA; HUNGRIA, 2002).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são conhecidas no Brasil por sua eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico no solo e pela fácil simbiose com plantas da família *Fabaceae*. Os gêneros mais usados para a lavoura de soja no Brasil é dividido em duas espécies, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (BODDEY; HUNGRIA, 1997). Não é por acaso que essas bactérias são amplamente utilizadas no plantio dessa espécie leguminosa como agentes biológicos fixadores de nitrogênio. De acordo com Lopes, (2018) a economia com adubação nitrogenada para os produtores rurais e para o governo brasileiro é de cerca de 42,3 bilhões de reais.

A associação simbiótica entre o *Bradyrhizobium* e as plantas de soja forma uma estrutura chamada de nódulo, local onde é fixado o nitrogênio atmosférico. A formação de nódulos e o desenvolvimento das bactérias na planta inicia-se através da expressão de genes ativados pela presença de compostos químicos exsudados pelas plantas e bactérias. Quando os nódulos estão em intensa fixação biológica de nitrogênio é possível notar no interior dos nódulos uma coloração rósea avermelhada. Esta coloração é característica da atividade da leghemoglobina que tem a função de transportar oxigênio, importante para as atividades vitais de microrganismos aeróbicos como os dessa espécie (HUNGRIA et al., 2010).

Além do *Bradyrhizobium* existe outros microrganismos benéficos que podem ser utilizados na agricultura com outros fins. Eles podem ser destacados em três grupos principais: as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), os fungos promotores de crescimento de plantas (PGPF) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). As PGPR são formadas pelos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Bacillus*, os PGPF pelo gênero *Trichoderma* e os FMA por associações micorrízicas de fungos arbusculares (BODDEY; HUNGRIA, 1997; HARMAN, 2006; MIRANSARI et al., 2009; GALINDO et al., 2018).

As PGPR podem se comportar como biofertilizantes, bioestimulantes e atuar também no controle de pragas e doenças alterando de forma direta e/ou indireta o desenvolvimento de várias culturas agrícolas como a soja (MASCIARELLI; LLANES;

LUNA, 2014; SUBRAMANIAN et al., 2015; MEENA et al., 2018), milho (BREEDT; LABUSCHAGNE; COUTINHO, 2017), arroz (GRANADA et al., 2014) e trigo (KUMAR et al., 2017). As PGPR possuem mecanismos de ação que podem promover a tolerância das plantas a vários estresses bióticos e abióticos durante seu desenvolvimento (KUMARI et al., 2015; CERZINI et al., 2016; VURUKONDA et al., 2016; ARFAOUI et al., 2018).

Em relação aos PGPF, destaca-se a utilização de *Trichoderma spp.* De acordo com HARMAN (2006), vários mecanismos podem ser explorados por diferentes espécies de *Trichoderma spp.* como: o controle de patógenos nas raízes e folhas, indução a resistência biótica e abiótica, controle de doenças por meio de mecanismos diretos e indiretos, alteração da microbiota na rizosfera, aumento da aquisição de nutrientes, aumento da solubilização de nutrientes, incremento do sistema radicular, aumento do volume de pelos radiculares e aprofundamento das raízes no solo.

Quanto aos FMA, estas são uma associação simbiótica entre fungos e plantas, especificamente ligadas ao sistema radicular, capaz de promover o crescimento de plantas (OLIVEIRA et al., 2016). Os fungos mais comuns envolvidos nesta associação são divididos em dois grandes grupos, micorrizas arbusculares (MA) e ectomicorrizas (ECM). Os fungos Micorrizicos Arbusculares (FMA) são os mais abundantes e comumente encontrados nos solos agrícolas (NADEEM et al., 2014). Os fungos micorrízicos do grupo arbuscular atuam especialmente facilitando a absorção de nutrientes de baixa difusão como o fósforo (MEENA et al., 2018). Do mesmo modo, a associação com a planta pode aumentar o fluxo de outros nutrientes como N, K, Mg, Cu e Zn, amenizando efeitos de estresses. Além disso, esta associação pode aumentar a capacidade antioxidante e modificar a estrutura radicular das plantas de maneira benéfica (NADEEM et al., 2014).

Então, os microrganismos benéficos podem promover o crescimento das plantas de três formas, alterando os estímulos hormonais da planta, controlando ou competindo com microrganismos patógenos e aumentando o aporte de água e nutrientes para as plantas (JACOBY et al., 2017). Assim, estimulam o crescimento alterando a arquitetura radicular, elevando os níveis de auxina, giberelina, citocinina, aumentando o aporte de água e nutrientes (P, N, K, Mg, Cu, e Zn), aliviando estresses causados por acúmulo de metal pesado, salinidade, restrição hídrica e até agindo no controle de pragas e doenças importantes para cultura da soja (BENÍTEZ et al., 2004; HUNGRIA et al., 2010; NADEEM et al., 2014; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014; LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-

FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015; PARRAY et al., 2016; PARK et al., 2017; LÜ; ZOU; WU, 2018).

A inoculação de microrganismo em plantas tem como base a adição de uma solução concentrada de células de um determinado microrganismo benéfico nas sementes, solo ou outras estruturas vegetais, como folhas e raízes. Assim, a coinoculação é a inoculação de uma combinação de mais de um microrganismo benéfico às plantas. Estas combinações têm como princípio maximizar os efeitos dos microrganismos benéficos quando comparado a uma simples inoculação. Essas combinações permitem de certo modo que os microrganismos amplifiquem os seus mecanismos promotores de crescimento de plantas, uma vez que a coinoculação utiliza diferentes espécies de microrganismos. Por exemplo, *Azospirillum brasilense* com *B. japonicum* gera economia com adubos nitrogenados e crescimento radicular (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013); *Bacillus subtilis* com *B. japonicum* é eficiente no controle de patógenos de sementes de soja e promoção do crescimento de plantas (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005); *Trichoderma asperellum* com *B. japonicum* destaca-se no controle biológico de doenças e promoção de crescimento de plantas de várias espécies (HARMAN, 2006; AYOUBI; ZAFARI; MIRABOLFATHY, 2012); e FMA com *B. japonicum* capaz de aumentar a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes, incluindo maior acesso a fontes de água (NADEEM et al., 2014; MEENA et al., 2018).

É sabido que o vigor das sementes tem influência direta no estabelecimento da cultura e na produtividade das lavouras de soja, sendo que o uso de sementes de baixo vigor prejudica a emergência das plântulas e, conseqüentemente, reduz a produção (SÁ; AZEVEDO, 2012; OLIVI; PIMENTA, 2018). De acordo com FINCH-SAVAGE; BASSEL (2016), os efeitos negativos de sementes menos vigorosas podem ocorrer de maneira direta e indireta. O impacto direto é notado logo após a semeadura da cultura, ou seja, na baixa emergência de plântulas em campo. Já o efeito indireto é percebido na redução da produção, uma vez que o número de plantas planejado não é atingido. No entanto, ainda não há estudos em que são avaliados o efeito da coinoculação com microrganismos benéficos em sementes de baixa qualidade fisiológica sobre o crescimento das plantas e a produtividade das plantas de soja. Assim, estes microrganismos poderiam ser utilizados para mitigar os efeitos do baixo vigor das sementes e estimular o crescimento das plantas.

Diante disso, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de microrganismos benéficos em coinoculação em sementes de soja com diferentes níveis de vigor no crescimento das plantas e na produtividade.

MATERIAL E MÉTODOS

A condução do experimento foi realizada em casa de vegetação, no período de fevereiro a maio de 2018, na Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados três lotes de sementes de soja com diferentes níveis de vigor da cultivar M 7110 IPRO produzidas na safra 2016/2017 em Paracatu, Minas Gerais. Essas sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* em associação com quatro microrganismos benéficos *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e Fungos Micorrízicos Arbusculares. Para isso foram estabelecidos os seguintes tratamentos e determinações:

TRATAMENTOS

Os tratamentos foram constituídos por três níveis de vigor das sementes - alto, médio e baixo; e pela inoculação das sementes com os seguintes microrganismos em associação com o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080:

1. *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium japonicum*;
2. *Bacillus subtilis* + *Bradyrhizobium japonicum*;
3. *Trichoderma asperellum* + *Bradyrhizobium japonicum*;
4. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) + *Bradyrhizobium japonicum*;
5. *Bradyrhizobium japonicum* (controle).

O controle consistiu de sementes inoculadas apenas com *Bradyrhizobium japonicum*. Afim de evitar incompatibilidades e interações com os microrganismos, nenhum outro tratamento de sementes foi realizado.

Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 3 x 5, ou seja, três níveis de vigor das sementes e cinco níveis de coinoculação, totalizando quinze tratamentos.

LOTES DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR

Para obtenção dos lotes de sementes com diferentes níveis de vigor, um lote matriz foi dividido em três partes iguais de 1 kg e submetidos ao processo de envelhecimento artificial (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004). As sementes de cada lote foram organizadas sobre tela metálica acoplada a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada. Em seguida, as caixas foram organizadas em uma câmara tipo Demanda

Bioquímica de Oxigênio (BOD) e mantidas a 42 °C por diferentes períodos, para obtenção de três níveis de vigor (MARCOS FILHO, 1999).

O lote de sementes de alto vigor foi formado por sementes não submetidas ao envelhecimento artificial. Já os lotes de sementes de médio e baixo vigor foram submetidos a 10 e 20 horas de envelhecimento artificial, respectivamente. Estes tempos foram determinados por meio de testes preliminares que permitiram a redução da qualidade das sementes e ao mesmo tempo que ficassem acima dos padrões mínimos estabelecidos pelo MAPA para serem comercializadas (BRASIL, 2013).

OBTENÇÃO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS

As análises para a caracterização dos microrganismos foram conduzidas no Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Foram utilizadas fontes comerciais das rizobactérias promotoras de crescimento *Azospirillum brasilense* AbV-5, *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 e o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080, bem como o fungo *Trichoderma asperellum* URM 5911. Os isolados de FMA *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, www.furb.br/cicg) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, SC. Estes isolados foram multiplicados em solo:areia (1:1, v:v) e cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf).

Os produtos comerciais contendo as bactérias promotoras de crescimento de plantas e o fungo *T. asperellum* tiveram suas concentrações verificadas de acordo com o método de diluição seriada, seguido de semeadura em meio de cultura. As diluições 10^{-1} dos produtos comerciais contendo as bactérias foram preparadas com a aplicação de alíquotas de 1,0 mL das amostras em tubos tipo Falcon contendo 9,0 mL de solução salina ($8,5\text{g L}^{-1}$ de NaCl) autoclavada. Para o fungo *T. asperellum*, a diluição de 10^{-1} foi obtida a partir de 0,1 g dos grânulos comerciais diluídos em 0,9 mL da mesma solução salina.

Posteriormente foram feitas diluições até as concentrações 10^{-6} e 10^{-7} dos inoculantes. Em seguida, alíquotas de 100 μL das diluições dos inoculantes foram espalhadas em placas de petri contendo 20,0 mL de meio de cultura YMA, LGI e BDA. Após a inoculação, nos meios de cultura, as placas foram incubadas em câmara tipo BOD a 25 °C até o crescimento das colônias microbianas. Os resultados foram expressos em unidade de formação de colônias por mL de inoculante (UFC/mL).

Os isolados de FMA tiveram a concentração de esporo avaliada de acordo com o método do peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963). Assim, amostras do solo de multiplicação de FMA foram peneiradas e centrifugadas com solução de sacarose a 50%. Depois, os esporos foram recolhidos, depositados em placa de Petri canaletadas e contados em microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes.

CARACTERIZAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES

A caracterização dos lotes de sementes foi realizada no Laboratório de Pesquisa de Sementes, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Estes foram analisados quanto ao teor de água, germinação e vigor por meio dos seguintes testes e determinações:

Teor de água - os lotes de sementes tiveram os seus teores de água determinados pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 h (BRASIL, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Germinação - para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram dispostas entre três folhas de papel *germitest* previamente umedecidos com água destilada no volume de 2,5 vezes o peso do papel seco. Logo após, foram confeccionados rolos, os quais foram organizados e mantidos em germinador tipo Mangelsdorf, a 25 °C. No quinto e oitavo dia após a semeadura foi realizada a contagem de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009a).

Primeira contagem de germinação - o teste foi realizado junto com o teste de germinação. No quinto dia após a semeadura do teste de germinação foi contabilizado o número de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Envelhecimento acelerado - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes. Amostras de 42 g de sementes de cada lote foram organizadas sobre telas metálicas acopladas a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada. Em seguida, as caixas foram mantidas em câmara tipo BOD, a 42 °C, durante 48 h (MARCOS FILHO, 1999). Após este período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente. A avaliação do número de plântulas normais foi feita no quinto dia após a montagem do teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Condutividade elétrica - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram pesadas e em seguida colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada. Os copos contendo as sementes foram mantidos a 25 °C por 24 h. Após este período, foi determinada a condutividade elétrica da solução por meio do

condutivímetro Digmed DM-31. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Emergência de plântulas - foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com capacidade de três litros. Para isso, as bandejas foram preenchidas com uma mistura de solo e areia na proporção de 2:1, respectivamente. Após a semeadura, o substrato foi umedecido inicialmente até a capacidade de campo e irrigado sempre que necessário. A avaliação do número de plântulas emergidas foi realizada diariamente, sendo consideradas emergidas aquelas com os cotilédones completamente acima da superfície do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem. Com os dados da avaliação diária também foi calculado o índice de velocidade de emergência (NAKAGAWA, 1999).

Comprimento de plântulas - para a determinação do comprimento de plântulas foram utilizadas dez plântulas, coletadas na parte central de cada bandeja do teste de emergência. As plântulas foram retiradas com o auxílio de água corrente e peneira para evitar perda de raízes. Em seguida, as plântulas foram estendidas e fotografadas com câmera digital. Para medir os comprimentos de hipocótilo e radícula das plântulas foi utilizado o software ImageJ® (FERREIRA; RASBAND, 2009). Os resultados foram expressos em centímetros.

Matéria seca de plântulas - após a aquisição das imagens, as plântulas tiveram suas estruturas separadas em hipocótilo e radícula. Estas foram então armazenadas em sacos de papel tipo Kraft para secagem, sendo utilizada uma estufa de circulação de ar forçado, pelo período de 72 h, a 65 °C. Após a secagem, o material foi pesado em balança de precisão (0,0001g) para determinação da matéria seca. Os resultados foram expressos em mg/plântula.

Teste de sanidade - foi conduzido de acordo com as normas descritas em BRASIL (2009b) e adaptações. Uma amostra de 400 sementes do lote matriz foi submetida ao teste tipo *Blotter*, no esquema 20 sementes x 20 caixas de plástico transparente tipo *gerbox*. Para evitar contaminações, o papel filtro foi esterilizado em estufa por 20 minutos à 160 °C e a água destilada para umedecer o papel foi autoclavada a 121 °C por 20 min. A montagem das caixas com as sementes foi realizada em uma câmara de fluxo laminar. As sementes foram distribuídas individualmente sobre o papel filtro umedecido com solução de 5 ppm de sal 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) e água destilada no volume de 2,5 vezes o peso do papel filtro seco.

Em seguida, as caixas foram envolvidas em sacos plástico transparente e incubadas em germinador por um período de sete dias. As caixas foram mantidas sob

lâmpadas de luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 8 h sob luz e 16 h no escuro, na temperatura de 20 ± 2 °C. As sementes foram examinadas individualmente por meio de um estereomicroscópio de resolução 30-80X e microscópio ótico. Os resultados foram apresentados em percentual de ocorrência dos fungos.

EXPERIMENTO DE COINOCULAÇÃO

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura de $32,3 \pm 0,70$ °C durante o dia e $21,7 \pm 0,64$ °C durante a noite, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, no período de fevereiro a maio de 2018.

Após a caracterização dos lotes de sementes, estas foram inoculadas com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em associação com os microrganismos benéficos, como descrito anteriormente. Em seguida, as sementes foram semeadas seguindo os seguintes procedimentos:

PREPARO, ANÁLISE E ADUBAÇÃO DO SOLO

A semeadura foi realizada em vasos de polietileno com capacidade de três litros preenchidos com uma mistura de solo e areia. Para isso foi utilizado solo não cultivado, peneirado e não esterilizado na proporção 2:1 com areia também peneirada e não esterilizada (Figura 1). Logo após uma amostra do substrato foi enviada para análise química, sendo obtidos os seguintes valores: pH em água: 5,2; macronutrientes P: 5,0 mg/dm³, K: 74,0 mg/dm³, Ca²⁺: 2,4 cmol_c/dm³ e Mg²⁺: 0,6 cmol_c/dm³; SB: 3,2 cmol_c/dm³, CTC (t): 3,2 cmol_c/dm³, CTC (T): 6,0 cmol_c/dm³, V: 53 % e P-rem: 37,1 mg/L. Já as análises referentes ao alumínio, como acidez trocável (Al³⁺) e saturação por Al³⁺ (m), não foi notado presença. A acidez potencial (H + Al) foi de 2,8 cmol_c/dm³.

A adubação com macro e micronutrientes foi efetuada a partir da análise do solo, de acordo com RIBEIRO; GRIMARÃES; ALVAREZ (1999). Foi aplicado fósforo na dose de 1500 mg/dm³ de superfosfato simples (P₂O₅) e 210 mg/dm³ de cloreto de potássio (KCl) antes da semeadura. Não foi utilizada nenhuma fonte de nitrogênio. A partir do estágio V3 de desenvolvimento das plantas foi aplicada uma solução nutritiva de micronutriente nas seguintes proporções: 0,818 mg/dm³ de B; 3,664 mg/dm³ de Mn; 4,000 mg/dm³ de Zn; 1,329 mg/dm³ de Cu e 1,556 mg/dm³ de Fe. Por fim, foi realizada aplicação foliar do fertilizante NiCoMol Dry® na dose de 175 g/100 L de água.

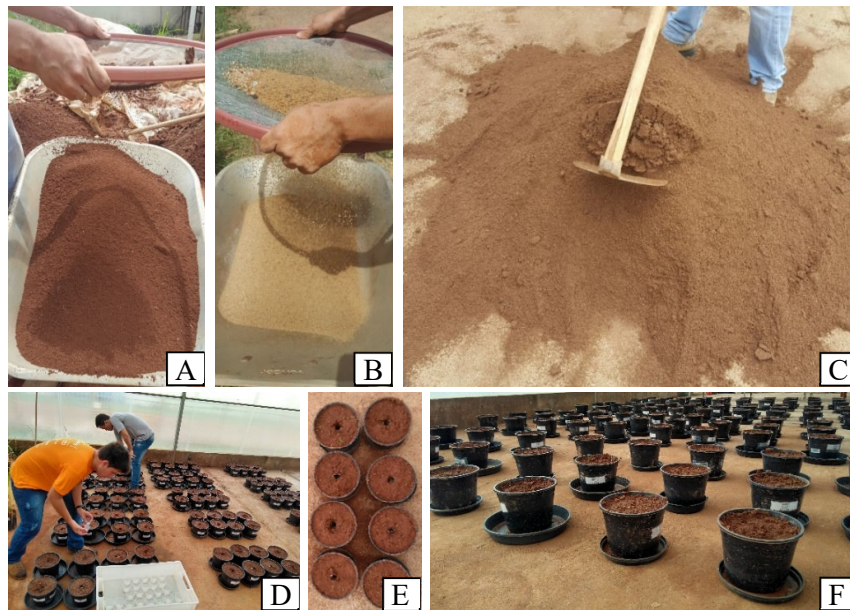


Figura 1. Preparo dos vasos para a semeadura da soja. A - Solo não cultivado, peneirado e não autoclavado; B - areia peneirada e não autoclavada; C - substrato na mistura 2:1; D - fertilização com fósforo e potássio, E - fertilização de fósforo centralizada nos vasos; e F - vasos experimentais arranjados em bloco.

INOCULAÇÃO DAS SEMENTES

As concentrações de células viáveis dos microrganismos benéficos foram determinadas nos inoculantes comerciais contendo *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* (Tabela 1). Após a identificação das concentrações dos microrganismos em cada inoculante, as sementes foram tratadas de acordo com as doses e volumes apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Concentrações de células viáveis de microrganismos benéficos utilizadas no tratamento de coinoculação com *B. japonicum* em sementes de soja cultivar M 7110 IPRO.

Microrganismo benéficos	Meio de cultura	UFC/mL (Inoculação)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	YMA	8,6 x 10 ⁹
	LGI	8,4 x 10 ⁹
<i>Azospirillum brasilense</i>	BDA	3,5 x 10 ⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	BDA	1,2 x 10 ⁷
<i>Trichoderma asperellum</i>	BDA	1,1 x 10 ¹⁰

UFC - Unidades Formadoras de Colônias, YMA. - Yeast Malt Agar, LGI - meio de cultura livre de nitrogênio, BDA - Batata Dextrose Ágar.

Tabela 2. Doses e volumes de calda dos inoculantes utilizados em associação com o *B. japonicum*.

Microrganismos	mL e g / kg de sementes			
	Quantidade	<i>B. japonicum</i> (mL)	Água (mL)	Calda Base (mL)
<i>A. brasilense</i> ^{/1}	2,0 mL	2,0	4,0	8,0
<i>B. subtilis</i> ^{/1}	2,0 mL	2,0	4,0	8,0
<i>T. asperellum</i> ^{/1}	1,0 g	2,0	5,0	8,0
FMA ^{/1}	50 esporos/semente	2,0	6,0	8,0
Controle	-	2,0	6,0	8,0

FMA - Fungos micorrízicos arbusculares; Controle - somente *Bradyrhizobium japonicum*. ^{/1} - inoculação em conjunto com *Bradyrhizobium japonicum*.

As doses utilizadas dos produtos contendo as bactérias *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* foram de 2,0 mg/kg de semente de soja. Já a dose do produto contendo o inóculo *Trichoderma asperellum* foi de 1 g/kg de semente.

Após o preparo das caldas bases, as sementes foram tratadas com a adição de alíquotas dos inoculantes às sementes, dentro de sacos de polietileno (Figura 2). As sementes e os inoculantes foram agitados em movimento circular por 1 minuto para garantir cobertura homogênea dos inóculos nas sementes. Afim de evitar a secagem rápida do inoculante e facilitar a fixação dos microrganismos, foi adicionado mais 1,0 mL de água, o que facilitou a distribuição do inoculante por toda a superfície das sementes. As sementes foram semeadas 1 h após a realização do tratamento (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

O substrato contendo os inóculos com FMA foi distribuído em sucos de semeadura nos vasos. Foram efetuados seis furos de 5 a 7 cm de profundidade no substrato, seguido da aplicação de 25 mL do substrato com o inóculo de FMA em cada furo. Logo após, as sementes foram posicionadas na profundidade de 3 a 4 cm e cobertas com solo de cultivo (Figura 2). O volume total de inóculo foi de aproximadamente 150 mL/vaso ou 50 esporos/semente.



Figura 2. Processo de coinoculação das sementes com *B. japonicum* em associação com microrganismos benéficos. A - Aplicação dos inoculantes, B - aplicação de FMA no substrato, CB - calda base de coinoculação e Pi - pipeta de inoculação.

SEMEADURA E CONDUÇÃO DAS PLANTAS

Seis sementes de soja previamente inoculadas foram semeadas em vasos de polietileno como descrito anteriormente. Após a emergência foi realizado o desbaste das plantas e apenas duas plântulas, as mais vigorosas, foram mantidas nos vasos para continuar o seu desenvolvimento.

Para que o experimento atendesse as duas fases de desenvolvimento, vegetativa e produtiva, o experimento foi conduzido em duplicata. A primeira foi utilizada para

avaliação na fase vegetativa e a segunda para a avaliação da produtividade, conforme descrito a seguir (Figura 3):

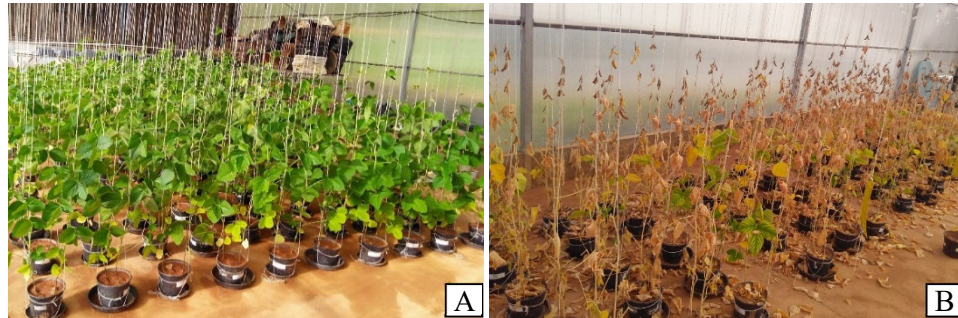


Figura 3. A - plantas na fase vegetativa (R2), com 50 dias de desenvolvimento; e B - plantas em fase de colheita (R8), com 110 dias de desenvolvimento.

AVALIAÇÃO VEGETATIVA

Quando as plantas atingiram o estágio reprodutivo R2 (FEHR; CAVINESS, 1977), estas foram avaliadas quanto ao índice SPAD e número de folhas trifolioladas. Em seguida, as plantas foram coletadas e submetidas às seguintes avaliações: área foliar, matéria seca total, teor de nitrogênio nas folhas, número de nódulos, matéria seca de nódulos e colonização micorrízica.

Índice SPAD - o conteúdo relativo de clorofila nas folhas foi avaliado pelo método *Soil Plant Analysis Development* (SPAD), com o equipamento SPAD 502 Plus Chlorophyll Meters (BRAHIM et al., 2017). Para isso, foi obtida a leitura da folha central do último trifólio completamente expandido de uma das plantas de cada vaso.

Número de folhas e área foliar - Estas avaliações foram realizadas no início da manhã, a fim de evitar a perda do turgor do limbo foliar. O número de folhas trifolioladas/planta foi anotado e, em seguida, as folhas trifolioladas foram coletadas. Após o corte na base do pecíolo foliar, as folhas foram armazenadas em sacos de papel tipo Kraft para transporte e subsequente análise. A área do limbo foliar foi medida no equipamento Li-cor Area Meter modelo 3100. Os resultados foram expressos em $\text{cm}^2/\text{planta}$.

Matéria seca da planta - a parte aérea das plantas foram separadas das raízes. Estes materiais vegetais foram individualmente armazenados em sacos de papel tipo Kraft para secagem. No processo de secagem foi utilizado uma estufa de circulação de ar forçado por um período de 72 h a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as estruturas foram pesadas em

balança de precisão de 0,0001g para determinação da matéria seca. Os resultados foram expressos em mg.

Teor de nitrogênio nas folhas - a análise do nitrogênio total no tecido das folhas foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida por Tedesco et al. (1995). As folhas secas foram trituradas, peneiradas em tela metálica e armazenadas em potes plásticos para posterior análise. Amostras de 0,2 g foram digeridas em uma mistura digestora de Na₂SO₄ (200g), CuSO₄ (20g), Se (2g) e 5 mL de H₂SO₄, sob temperatura aproximada de 350 °C.

Após a digestão foi realizada a destilação das amostras em 25 mL de H₃BO₃, NaOH mais indicador misto de verde de bromocresol e vermelho de metila. Terminada a destilação, as amostras foram tituladas com HCl até atingir uma coloração rósea clara. Por fim, o volume de HCl utilizado na destilação de cada amostra foi inserido no seguinte cálculo para a determinação da porcentagem de nitrogênio:

$$\% N = (\text{leitura} - \text{branco}) \times 14/1000 \times n \times f \times 100/0,2$$

Em que:

- % N = porcentagem de N total;
- Leitura = volume de HCl utilizado na destilação de cada amostra (mL);
- Branco = volume de HCl utilizado na destilação do controle, amostra sem folhas trituradas, (mL);
- n = 0,1 mol/L de HCl;
- f = Fator de correção, concentração de H⁺ verdadeira/concentração teórica.

Número de nódulos - as raízes foram retiradas dos vasos utilizando água corrente e peneira para evitar perdas de raízes e nódulos durante a extração. Em seguida, as raízes com os nódulos foram conservadas em potes com álcool 40 % para posterior análise. Os nódulos foram separados das raízes e contabilizados, sem a distinção do tamanho dos nódulos, sendo os resultados expressos em número por planta.

Matéria seca de nódulos - os nódulos foram secos em estufa de circulação de ar forçado, por um período de 72 h, a 65 °C. Após esse período, os nódulos secos foram pesados em balança de precisão de 0,0001g para determinação da matéria seca. Os resultados foram expressos em mg/planta.

Colonização micorrízica - Amostras de raízes finas foram coletadas dos vasos dos tratamentos com aplicação de fungos micorrízicos arbusculares. As raízes foram armazenadas e conservadas em solução de álcool, formol e ácido acético (90:5:5, v:v:v).

Em seguida, estas foram lavadas, diafanizadas com KOH 10 % (p:v), por aquecimento em banho-maria a 90 °C, por 1,5 h. Após imersas em KOH 10 % (p:v) por 1,5 h em banho maria, as raízes receberam sucessivas lavagens em água, acidificadas com HCl 1 % (v:v) por 7 min. e coradas com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v) por 12h a temperatura ambiente (adaptado de PHILLIPS; HAYMAN, 1970).

Após a coloração, as raízes foram armazenadas em lactoglicerol (p:v) (BRUNDRETT et al., 1996). A colonização micorrízica foi estimada em percentagem pelo método de contagem em placa quadriculada, onde foi observado com a ajuda de microscópio estereoscópio a presença de estruturas fúngicas como arbúsculos, hifas, vesículas e esporos (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980).

AVALIAÇÃO PRODUTIVA

Quando as plantas alcançaram o estágio R8 (CÂMARA, 2015), mais de 95 % das vagens maduras, as vagens foram colhidas e debulhadas manualmente. Após a colheita, foram determinados: número de vagens, número de sementes por planta, peso de 100 sementes e tamanho de sementes.

Número de vagem - foi contabilizado apenas as vagens que apresentaram sementes (OLIVEIRA et al., 2017). O resultado foi expresso em número de vagens por planta.

Número de sementes por planta - as vagens foram debulhadas, as sementes contabilizadas e divididas pelo total de plantas.

Peso de 100 sementes - as sementes foram contadas e pesadas, sendo o peso convertido para 100 sementes. Os resultados foram expressos em gramas.

Tamanho de sementes - foi estimado por meio de análise de imagens. As sementes produzidas foram fotografadas, utilizando-se uma câmera digital. Em seguida, as imagens foram analisadas no software ImageJ®, utilizando-se a ferramenta Análise de Partículas. Os resultados foram expressos em mm/semente.

Produção por planta - O peso da produção de cada planta consistiu no peso de sementes produzidas por planta. O resultado foi expresso em gramas de sementes/planta.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 5, ou seja, três níveis de vigor de sementes (alto, médio e baixo) e cinco coinoculações de microrganismos benéficos com *Bradyrhizobium japonicum*. Os

dados obtidos foram verificados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e submetidos à análise de variância. As médias obtidas para os níveis de vigor foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$) e as médias obtidas para os tratamentos de coinoculação foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As análises foram efetuadas no software estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUALIDADE DAS SEMENTES

Os três lotes de sementes apresentaram diferentes níveis de vigor (Tabela 3). Não houve diferença na porcentagem de germinação, comparando-se os três lotes, porém o lote 1 se destacou como o de maior nível de vigor, apresentando maior porcentagem de emergência e menor valor de condutividade elétrica (CE), comparado aos demais lotes. O lote 2 pode ser classificado como de vigor intermediário, diferindo do lote 1 apenas nos valores de CE, apresentando maior valor, e no comprimento de raiz, apresentando menor valor. Já o lote 3, classificado como o de menor vigor, apresentou menores valores nos testes de emergência, envelhecimento acelerado (EA), índice de velocidade de emergência (IVE), e maior valor de CE.

Portanto, o Lote 1, que não foi submetido ao envelhecimento artificial, apresentou melhor desempenho. Já os Lotes 2 e 3, submetidos a 10 e 20 horas de envelhecimento artificial, respectivamente, tiveram o seu vigor reduzido.

Com o envelhecimento artificial as sementes são submetidas a alta temperatura e a elevada umidade relativa. Essas condições em conjunto provocam a deterioração das sementes, ligada principalmente ao acúmulo nas células de espécies reativas de oxigênio (EROs), como H_2O_2 , O_2^- , OH^- . O acúmulo das EROs desencadeia uma série de processos degenerativos causando lesões celulares e provocando redução da qualidade fisiológica das sementes. Os principais danos são: a peroxidação de lipídeos, perda da viabilidade das membranas, perda da viabilidade das mitocôndrias, danos ao DNA, redução de ATP, perda da compartimentalização celular, e desbalanço metabólico (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004; JEEVAN KUMAR et al., 2015). Em decorrência deste processo e do acúmulo de danos, ocorre a redução da qualidade das sementes, associado ao aumento nos valores de C.E., conforme observado para os Lotes 2 e 3.

É importante destacar, porém, que os três lotes utilizados para o estudo apresentaram elevada qualidade fisiológica. A porcentagem de germinação e emergência de plântulas foram maiores que 95 %, para os três lotes. Assim, apesar da diferença de

vigor observada, os três lotes atendem aos padrões para comercialização de sementes de soja exigidos pela legislação (BRASIL, 2013).

Ainda, no teste de sanidade para o lote matriz, foram observados apenas o fungo patogênico *Macrophomina phaseolina*, além da presença de contaminantes ou saprófitos, como bactérias e *Cladosporium spp*, em todos os casos com infecção menor que 1 %.

Tabela 3. Umidade, germinação e testes de vigor em lotes de sementes de soja submetidas ao envelhecimento artificial por zero, 10 e 20 horas.

Avaliação	Lotes			CV (%)
	1	2	3	
Umidade (%)	11,4 a	11,5 a	10,8 a	1,67
Germinação (%)	96 a	93 a	92 a	4,26
Primeira contagem (%)	95 a	91 a	90 a	4,03
Emergência (%)	95 a	90 ab	75 b	9,49
Envelhecimento (%)	78 a	73 a	45 b	9,47
IVE (unidade)	11,9 a	11,4 a	9,3 b	7,50
CE ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$)	88,5 c	110,6 b	129,2 a	8,36
Matéria seca H (mg)	1633,3 a	1662,9 a	1741,4 a	4,58
Matéria seca RA (mg)	438,3 a	412,5 a	449,1 a	8,12
Comprimento H (cm)	18,13 a	18,81 a	17,67 a	3,96
Comprimento RA (cm)	22,60 ab	20,58 b	23,68 a	5,35

CV - coeficiente de variação, IVE - índice de velocidade de emergência, CE - condutividade elétrica, H - hipocótilo e RA - radícula. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferiram entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

CRESCIMENTO DE PLANTAS E PRODUTIVIDADE

Não foi observada interação significativa entre os níveis de vigor das sementes e as coinoculações em todas as características de crescimento na fase vegetativa das plantas (Tabela 4). Ainda, não houve efeito do vigor das sementes em nenhum dos parâmetros avaliados.

O vigor das sementes tem efeito principalmente na emergência e na uniformidade de emergência de plântulas, ou seja, no estabelecimento da cultura. Assim, sementes de baixo vigor podem acarretar em baixa emergência e plantas desuniformes (CANTARELI et al., 2015), o que interfere no desenvolvimento das plantas (SCHEEREN et al., 2010) e pode afetar a produtividade (SCHUCH; KOLCHINSK; FINATTO, 2009). Porém, estes efeitos são variáveis com a qualidade das sementes, sendo que no presente trabalho, apesar de serem considerados três níveis de vigor, a qualidade das sementes utilizadas foi elevada (Tabela 3). Ainda, o menor crescimento inicial pode ser compensado durante o ciclo de desenvolvimento das plantas e pode deixar de ser observado (CAVERZAN et al., 2018). Em conjunto, estes fatores podem explicar não ter havido efeito do vigor das sementes no crescimento das plantas.

Ao contrário do observado para os níveis de vigor das sementes, a coinoculação com os microrganismos benéficos influenciou o desenvolvimento vegetativo das plantas (Tabela 4). Assim, as médias obtidas nas avaliações para as diferentes combinações foram comparadas com o controle (Figura 4), já que cada microrganismos possui um modo de ação e diferentes efeitos no crescimento das plantas (NADEEM et al., 2014; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014; LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015; PARRAY et al., 2016; LÜ; ZOU; WU, 2018), optou-se por não compará-los entre si.

Foi observada diferença significativa apenas entre o tratamento controle (*B. japonicum*) e a coinoculação com FMA para o número de folhas trifolioladas e a massa seca de nódulos (Figura 4). Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento controle e as co-inoculações, com exceção da matéria seca de nódulos quando analisada a 10% de significância. Como o número de folhas é uma característica ontogênica e, portanto, não é passível de ser alterada, infere-se que as plantas oriundas de sementes que receberam o tratamento de coinoculação com o FMA tiveram o seu crescimento mais rápido, comparado ao tratamento em que as sementes foram inoculadas apenas com *B. japonicum*. Assim, nestas plantas houve crescimento mais rápido e, portanto, formação de folhas novas mais rapidamente. Maior e mais rápido crescimento de plantas sob inoculação com FMA já foi observado (LÜ; ZOU; WU, 2018).

Para o aumento da matéria seca de nódulos é possível que a habilidade dos FMA em aumentar o aporte de água e nutrientes para as plantas, principalmente fósforo (NADEEM et al., 2014), também tenha beneficiado o crescimento das bactérias fixadoras de nitrogênio, ou seja, do *B. japonicum*. Contudo, não foi detectado aumento no teor de nitrogênio nas folhas (Figura 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância das características fisiológicas e morfológicas de plantas de soja cv M 7110 IPRO em R2, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Características avaliadas	Bloco	V	C	V*C	CV (%)
Grau de liberdade	3	2	4	8	
Total de nódulos	ns	ns	ns	ns	25,68
Massa seca de Nódulos	ns	ns	*	ns	9,86
Massa seca de raiz	*	ns	ns	ns	19,75
Massa seca parte aérea	*	ns	ns	ns	7,26
Total folhas trifolioladas	ns	ns	*	ns	8,91
Área foliar total	ns	ns	*	ns	9,1
SPAD	*	ns	ns	ns	5,89
Concentração de nitrogênio	*	ns	ns	ns	6,89

V - Vigor de sementes, C - coinoculação, CV - coeficiente de variação. * - significativo e ns - não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F.

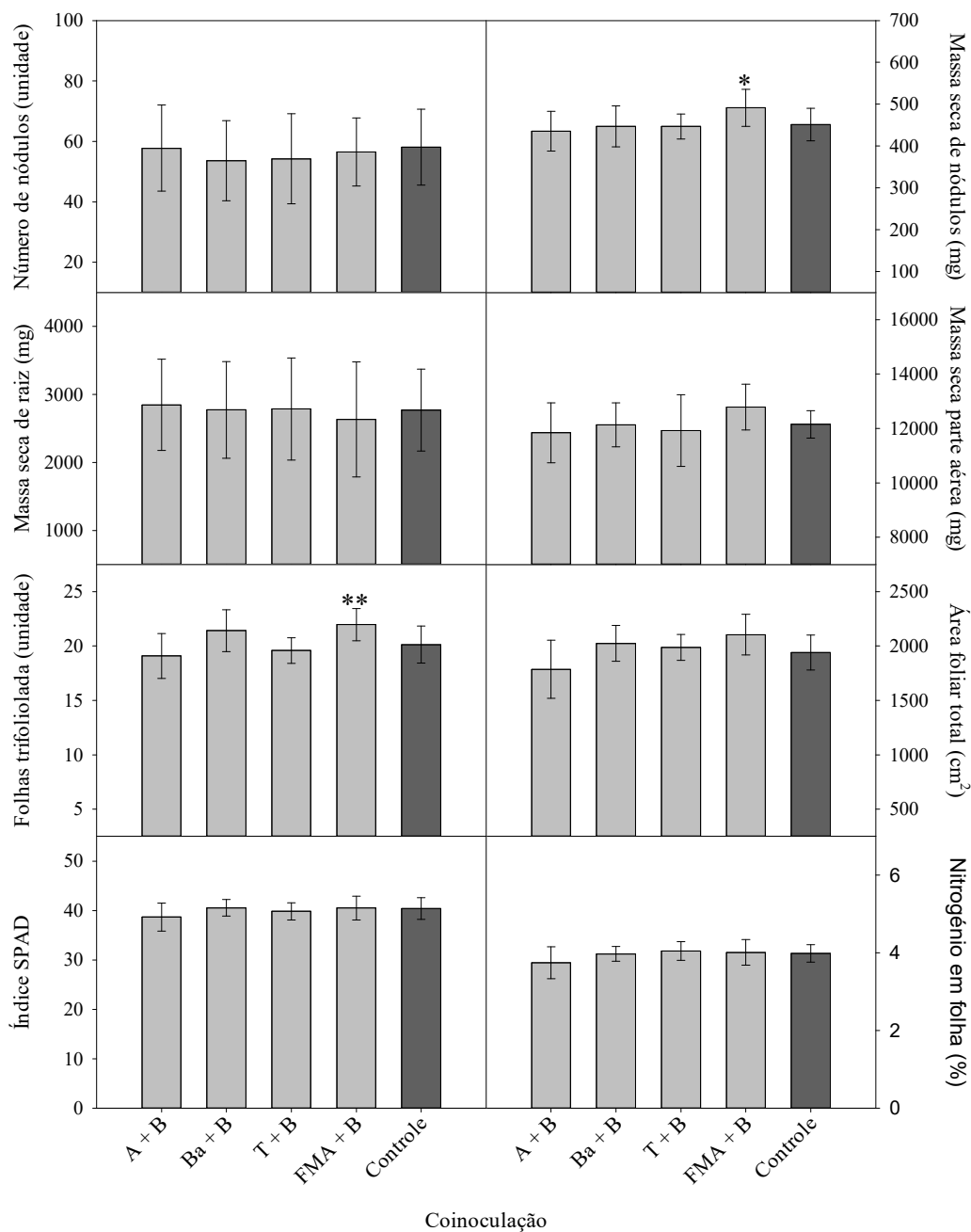


Figura 4. Características fisiológicas e morfológicas de plantas de soja cv M 7110 IPRO no estágio R2, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com *B. japonicum* e coinoculadas com diferentes microrganismos benéficos. * - significativo a 5 % e ** - significativo a 10 % de probabilidade pelo teste Dunnett em relação ao controle. As barras representam o desvio padrão, A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares, B - *Bradyrhizobium japonicum* e controle - somente *Bradyrhizobium japonicum*.

A associação simbiótica dos FMA favorece o desenvolvimento do sistema radicular e a promoção do crescimento da planta. Os fungos que compõem o grupo das micorrizas arbusculares é o mais abundante e o mais comumente encontrado nos solos agrícolas (NADEEM et al., 2014). Isso porque essa espécie de fungo tem a capacidade de estabelecer associações com um vasto grupo de plantas agrícolas, incluindo espécies florestais.

Os FMA penetram no córtex das raízes formando haustórios que não penetram nas células vegetais permitindo a troca de metabólitos entre os fungos e as plantas as quais estão associadas (Figura 5 A, D e E). Além disso, as hifas produzidas por estes fungos ajudam as raízes das plantas a explorarem grandes volumes de solo por meio de uma rede de absorção (Figura 5 B). Isso permite com que as plantas tenham mais acesso a nutrientes minerais e água (MIRANSARI et al., 2009). Outras estruturas como vesículas e esporos são formadas pelos FMA como fonte de reserva para o seu próprio crescimento, sobrevivência e propagação da espécie (Figura 5 D e F).

Para isso, as inoculações com FMA são geralmente realizadas com a misturas de cepas capazes de colonizar as raízes das plantas. Objetiva-se com a mistura de cepas de FMA a variação intraespecífica entre os fungos micorrízicos arbusculares, uma vez que esta variação potencializa os aspectos positivos já destacados deste tipo de associação (HEIJDEN; WIEMKEN; SANDERS, 2003). Sendo assim, esse trabalho utilizou a mistura dos FMA: *Claroideogломus etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, www.furb.br/cicg).

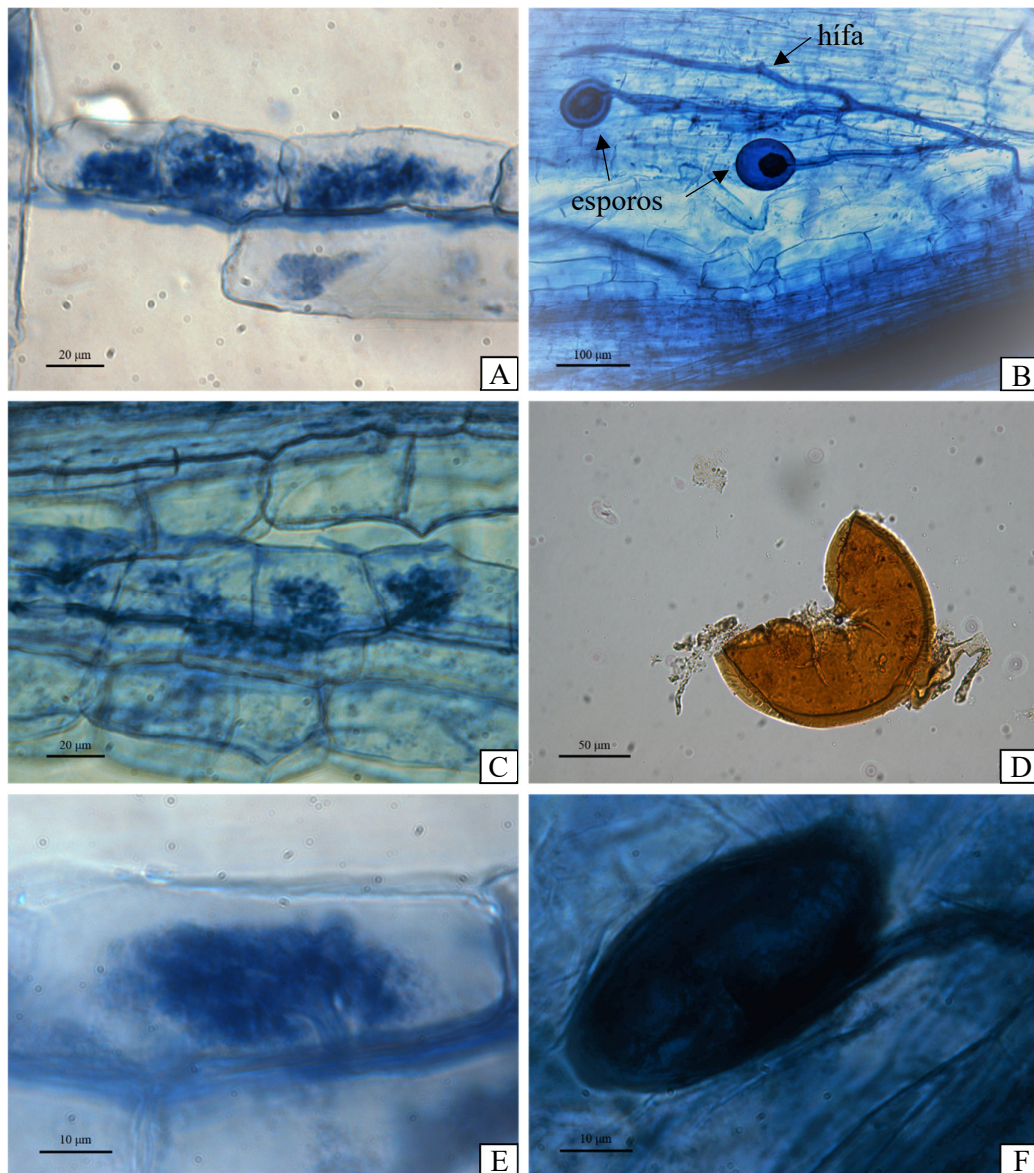


Figura 5. Estruturas de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de soja. A, C e E - arbusculos, B - hifas, D - esporo e F-Vesícula.

Além das características das plantas avaliadas no estágio vegetativo, também foram avaliados parâmetros de produção. De maneira oposta ao observado para as características de crescimento das plantas (Tabela 4), a interação entre os fatores, vigor de sementes e coinoculação de microrganismos benéficos, foram significativas para a maioria dos parâmetros no estágio produtivo, com exceção do número de vagens por planta, sendo que para este parâmetro não foi observado efeito do vigor das sementes e das coinoculações (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos dados de produtividade de plantas de soja cv M 7110 IPRO, oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, inoculadas com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Características avaliadas	Bloco	V	C	V*C	CV (%)
Grau de liberdade	3	2	4	8	
Sementes / planta	ns	ns	ns	*	16,06
Vagens / planta	ns	ns	ns	ns	12,96
Peso de 100 sementes	ns	ns	ns	*	13,33
Tamanho de sementes	*	*	ns	*	5,15
Produção / planta	*	ns	ns	ns	8,89

V - Vigor, C - coinoculação, CV - coeficiente de variação. * - significativo e ns - não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

As médias dos parâmetros de produção obtidas para os tratamentos de coinoculação não diferiram em relação ao controle, cujas sementes receberam inoculação apenas com *B. japonicum*. Estes dados não estão de acordo com o que é comumente observado na literatura, ou seja, efeito benéfico destes microrganismos no aumento da produtividade das plantas. Como exemplo, Silva et al. (2019) observou maior produtividade da soja, utilizando sementes coinoculadas com *B. japonicum* e *Azospirillum brasilense* sob condições de déficit hídrico. De maneira semelhante temos a coinoculação de *Bacillus subtilis* com *B. japonicum* incrementando o controle biológico de fungos patogênicos da soja e a promoção do crescimento radicular (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005); *Trichoderma asperellum* com *B. japonicum* promovendo o crescimento de plantas de soja e controle biológico de fungos patogênicos (HARMAN, 2006; AYOUBI; ZAFARI; MIRABOLFATHY, 2012); e FMA com *B. japonicum* promovendo o crescimento de plantas leguminosas, o aporte de nutrientes e o vigor das plantas em condições de estresse (NADEEM et al., 2014, MEENA et al., 2018). Porém, conforme salientado anteriormente, é possível que o ambiente controlado dentro da casa de vegetação tenha comprometido a observação dos efeitos benéficos dos microrganismos. Assim, experimentos de campo são recomendados para melhor entendimento dos efeitos benéficos dos microrganismos (NADEEM et al., 2014).

O número de sementes produzidas por plantas originadas de sementes de baixo vigor foi maior comparado ao número de sementes produzidas por plantas originadas de sementes de alto e médio vigor (Tabela 6). Já para os demais parâmetros, tamanho e peso de 100 sementes, o comportamento foi o oposto, ou seja, plantas originadas de sementes de alto e médio vigor produziram menos sementes e sementes maiores e mais pesadas do que plantas originadas de sementes de baixo vigor.

Tabela 6. Características de produção de plantas de soja cultivar M 7110 IPRO oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e coinoculadas com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *T. asperellum* e FMA.

Coinoculação	Vigor das sementes		
	Alto	Médio	Baixo
Número de sementes / planta			
A + B	58 a	54 a	58 a
Ba + B	62 a	65 a	53 a
T + B	49 b	51 b	69 a
FMA + B	61 a	59 a	57 a
Controle	50 b	48 b	67 a
Peso de 100 sementes (g)			
A + B	16,9659 a	18,2259 a	17,0567 a
Ba + B	16,6382 a	16,3657 a	19,1602 a
T + B	19,6341 a	19,6943 a	13,7164 b
FMA + B	17,0638 a	17,3286 a	17,7563 a
Controle	18,3444 ab	19,4518 a	15,2824 b
Tamanho de sementes (perímetro - mm)			
A + B	26,56 a	27,13 a	26,48 a
Ba + B	25,76 a	25,46 a	26,61 a
T + B	26,91 a	26,36 a	23,25 b
FMA + B	26,30 a	25,64 a	25,58 a
Controle	27,04 a	26,86 ab	24,58 b

A - *Azospirillum brasilense*, Ba - *Bacillus subtilis*, T - *Trichoderma asperellum*, FMA - Fungos Micorrízicos Arbusculares e B - *Bradyrhizobium japonicum*. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. As médias obtidas para os tratamentos de coinoculação não diferiram a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

As sementes de baixo vigor apresentaram maior número de sementes produzidas por planta, menor peso e tamanho dos grãos. Assim, houve um efeito direto do vigor das sementes sobre parâmetros de produtividade da soja. Em geral, sementes de baixo vigor apresentam desuniformidade de emergência de plantas, o que pode acarretar em menor densidade e desenvolvimento desuniforme das plantas e maturação desuniforme, o que

compromete a produtividade (CAVERZAN et al., 2018). Porém, efeito direto do vigor das sementes na produtividade é mais dificilmente observado.

Levando em consideração as coinoculações de microrganismos benéficos, apenas as plantas originadas de sementes que receberam a coinoculação com *Trichoderma asperellum* apresentaram padrão semelhante ao controle, em relação ao número de sementes e ao peso de sementes (Tabela 6). Para as demais coinoculações, não foram observados efeitos do vigor das sementes na produtividade. Assim, a coinoculação destes microrganismos benéficos contribuíram para o desenvolvimento de plantas originadas de sementes com diferentes níveis de vigor, o que é um resultado interessante, visto que o vigor das sementes pode impactar a produtividade das plantas em condição de campo (CAVERZAN et al., 2018).

Considerando que nas condições de campo pode ocorrer alguns estresses, bióticos e abióticos, como ataque de pragas e doenças, seca, salinidade, os efeitos benéficos dos microrganismos podem ser determinantes na manutenção da produção das plantas de soja. Alguns resultados promissores com estes microrganismos são encontrados para esta cultura (NADEEM et al., 2014; KUMARI et al., 2015; CERZINI et al., 2016; VURUKONDA et al., 2016; ARFAOUI et al., 2018; SILVA et al., 2019). Contudo, nem sempre a coinoculação proporciona aumento de produtividade ou promoção de crescimento, sendo que muitas vezes pode haver incompatibilidade de microrganismos (NADEEM et al., 2014). Destaca-se que no presente trabalho não foi observado efeito antagonista dos microrganismos avaliados.

Em resumo, podemos identificar que não houve efeito do vigor das sementes em nenhum dos parâmetros avaliados durante a fase de crescimento das plantas. Já para as coinoculações com microrganismos benéficos foi observado efeito no desenvolvimento vegetativo. Nesse fator foi identificada diferença significativa apenas entre o tratamento controle apenas com *B. japonicum* e a coinoculação com FMA para o número de folhas trifolioladas. No entanto, como essa característica é ontogênica, determinada ao longo do tempo de desenvolvimento da planta, infere-se que a coinoculação de FMA com *B. japonicum* acelerou o crescimento vegetativo das plantas de soja.

De maneira oposta ao observado no estágio vegetativo das plantas a interação entre os fatores, vigor de sementes e coinoculação de microrganismos benéficos, foi significativa para a maioria dos parâmetros analisados no estágio produtivo das plantas de soja. Dentre os parâmetros analisados foi observado que plantas oriundas de sementes de baixo vigor inoculadas somente com *B. japonicum* e com *Trichoderma asperellum* apresentaram maior número de sementes produzidas por planta, menor peso e tamanho

de sementes. Indicando assim um efeito direto do vigor das sementes sobre os parâmetros de produtividade da soja. Por outro lado, para as demais coinoculações, FMA, *A. brasilense* e *B. subtilis* com *B. japonicum*, não foram observados efeitos do vigor das sementes na produtividade das plantas. Assim, a coinoculação destes microrganismos benéficos aliviaram os efeitos negativos do baixo vigor das sementes.

CONCLUSÕES

1. A coinoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium japonicum* juntamente com fungos micorrízicos arbusculares aumenta o crescimento vegetativo de plantas de soja.
2. A coinoculação dos microrganismos benéficos *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e Fungos Micorrízicos Arbusculares com *Bradyrhizobium japonicum* são capazes de uniformizar características de produção de plantas oriundas de sementes de baixo vigor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.
- ARFAOUI, A. et al. Isolation and identification of cultivated bacteria associated with soybeans and their biocontrol activity against *Phytophthora sojae*. **BioControl**, p. 1–11, 2018.
- AYOUBI, N.; ZAFARI, D.; MIRABOLFATHY, M. Combination of *Trichoderma* species and *Bradyrhizobium japonicum* in control of *Phytophthora sojae* and soybean growth. **J. Crop Prot.**, v. 1, n. 1, p. 67–79, 2012.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 4, p. 407–415, 1997.
- BRAHIM, S. et al. Effect of combined fertilization with rock phosphate and elemental sulphur on yield and nutrient uptake of soybean. **Plant, Soil and Environment**, v. 63, n. 2, p. 89–95, 2017.
- BRASIL. **Regras para análise de semente**. Primeira ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009a.
- BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes, Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras Para Análise de Sementes**. Primeira ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009b.
- BRASIL. **Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013**. Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2018.
- BREEDT, G.; LABUSCHAGNE, N.; COUTINHO, T. A. Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. **Annals of Applied Biology**, v. 171, n. 2, p. 229–236, 2017.
- BRUNDRETT, M. et al. Examining mycorrhizal associations. In: BRUNDRETT, M. et al. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra, Austrália: The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 1996. p. 173–193.
- CÂMARA, G. M. DE S. Colheita. In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do Plantio a Colheita**. Viçosa, MG: UFV, 2015. p. 333.
- CANTARELI, L. D. et al. Variabilidade de plantas de soja originadas de sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Acta Agronômica**, v. 64, n. 3, p. 234–238,

2015.

CAVERZAN, A. et al. How does seed vigor affect soybean yield components? **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1318–1327, 2018.

CEREZINI, P. et al. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160–167, 2016.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Special report**, v. 80, n. March, p. 11, 1977.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v. 79, n. 2–3, p. 139–152, 2002.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **The ImageJ User Guide 1.44**. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2018.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.

GALINDO, F. S. et al. 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, n. 1, p. 51–56, 2018.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489–500, 1980.

GRANADA, C. E. et al. Diversity of native rhizobia isolated in south Brazil and their growth promotion effect on white clover (*Trifolium repens*) and rice (*Oryza sativa*) plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 1, p. 123–132, 2014.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HEIJDEN, M. G. A. VAN DER; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plants. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 569–578, 2003.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

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, n. 7, p. 791–801, 2013.

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.

JACOBY, R. et al. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–19, 2017.

JEEVAN KUMAR, S. P. et al. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.

KUMAR, A. et al. Co-inoculation with enterobacter and rhizobacteria on yield and nutrient uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) in the alluvial soil under indo-gangetic plain of india. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 3, p. 608–617, 2017.

KUMARI, S. et al. Bacterial-mediated induction of systemic tolerance to salinity with expression of stress alleviating enzymes in soybean (*Glycine max* L. merrill). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 3, p. 558–573, 2015.

LOPES, M. A. **A era dos insumos biológicos: como a biotecnologia é importante.** Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2018/08/era-dos-insumos-biologicos-como-biotecnologia-e-importante.html>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 109–123, 2015.

LÜ, L.; ZOU, Y.; WU, Q. Relationship between arbuscular mycorrhizas and plant growth: improvement or depression? In: GIRI, B.; PRASAD, R.; VARMA, A. (Eds.). **Root Biology. Soil Biology**. 1. ed. Jingzhou, Hubei, China: [s.n.]. v. 52p. 451–464.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. DE B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7–8, p. 609–615, 2014.

MEENA, R. S. et al. Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 207–223, 2018.

MIRANSARI, M. et al. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. **Soil and Tillage Research**, v. 103, n. 2, p. 282–290, 2009.

NADEEM, S. M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 429–448, 2014.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In:

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; NETO, J. DE B. F. (Eds.). **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

OLIVEIRA, C. O. E et al. Produção de sementes de soja enriquecidas com molibdênio. **Revista Ceres**, v. 64, n. 3, p. 282–290, 2017.

OLIVEIRA, R. S. et al. Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 7, p. 329–337, 2016.

OLIVI, J. B.; PIMENTA, I. **Mato Grosso quer plantar sementes próprias na 1ª quinzena de fevereiro**. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/videos/soja/227035-mato-grosso-quer-plantar-sementes-proprias-na-1-quinzena-de-fevereiro.html#.XD_cMVxKjIU>. Acesso em: 16 jan. 2019.

PARK, Y. G. et al. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–28, 2017.

PARRAY, J. A. et al. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 877–902, 2016.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5–6, p. 325–336, 2014.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158–161, 1970.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Áustria. R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

RIBEIRO, A. C.; GRIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em minas gerais - 5ª aproximação**. UFV ed. Viçosa, MG: Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, 1999.

SÁ, H. S.; AZEVEDO, D. B. **Piratária de sementes: influências e riscos para o agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Piratária-de-Sementes-influências-e-riscos-para-o-agronegócio-brasileiro.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. DE; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110–119, 2004.

SCHEEREN, B. R. et al. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 035–041, 2010.

SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSK, E. M.; FINATTO, J. A. Qualidade fisiológica da semente e desempenho de plantas isoladas em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 144–149, 2009.

SILVA, E. R. et al. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 3, p. 327–332, 2015.

TEDESCO, M. J. et al. **Analises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. DE B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES, 1999. p. 218.

VURUKONDA, S. S. K. P. et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016.