

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO
ESCOLA POLITÉCNICA E DE ARTES
CURSO DE AGRONOMIA**

**TESTE DE COMPATIBILIDADE DO *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* COM
24 LINHAGENS DE *TRICHODERMA SPP* NA SOJA (*Glycine max*)**

Rodrigo Fernandes Sales

Goiânia

2023

RODRIGO FERNANDES SALES

**TESTE DE COMPATIBILIDADE DO *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* COM
24 LINHAGENS DE *TRICHODERMA* SSP NA SOJA (*Glycine max*)**

Artigo apresentado como requisito parcial para composição de média final na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do curso de graduação em Agronomia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, PUC-Goiás.

Orientador: Profa. MSc. Ana Maria da Silva Curado Lins.

Co-Orientador: Dr. Murillo Lobo Junior.

Goiânia

2023

RODRIGO FERNANDES SALES

TESTE DE COMPATIBILIDADE DO *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* COM
24 LINHAGENS DE *TRICHODERMA SSP* NA SOJA (*Glycine max*)

BANCA EXAMINADORA

Ana Maria da Silva Curado Lins
Presidente MSc. Ana Maria da Silva Curado Lins
Pontifícia Universidade Católica-PUC/GO

Roberta Paula de Jesus
Membro I Dra. Roberta Paula de Jesus
Pontifícia Universidade Católica-PUC/GO

Andressa de Souza Almeida
Membro II MS. Andressa de Souza Almeida
Doutoranda-Universidade Federal de Goiás-UFG/GO

Aprovada em 11/12/2023.

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Delineamento do experimento	10
4.2 Preparo do solo e Autoclavação	11
4.3 Inoculação das sementes de Soja	11
4.4 Preparo dos <i>Trichodermas</i> isolados	11
4.4.1 Material utilizado	11
4.4.2 Metodologia	11
4.4.3 Preparo de pó de esporos	12
4.4.4 Preparo da suspensão de esporos	12
4.5 Semeadura	14
4.6 Desbaste	15
4.7 Desmonte do Experimento e Lavagem das Raízes	15
4.8 Contagem e Pesagem dos Nódulos	16
4.9 Análises Estatísticas	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Quantidade dos nódulos presentes nas raízes das plantas	18
5.2 Peso dos nódulos presentes nas raízes das plantas	19
5.3 Peso da massa seca das plantas	20
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS	23

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

	pag
Figura 1: Casa de vegetação na EMPRABA/ARROZ & FEIJAO, onde foram realizados os experimentos	10
Figura 2 A e B: Localização do campo 1 e 2 na câmara de Neubauer(A); Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem de conídios de <i>Trichoderma ssp</i> – E1, E2, E3, E4 e E5 (B)	13
Figura 3: Suspensões das linhagens de <i>Trichoderma ssp</i> utilizadas nos experimentos.....	13
Figura 4: Recipientes com as sementes da soja inoculada com <i>Bradyrhizobium</i> , juntamente com aplicação das doses de <i>Thichodermas ssp</i> diretamente no solo.....	14
Tabela 1- Delineamento do experimento da cultura da soja com o uso de <i>Trichodermas</i> associado ao <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , do experimento conduzido na Área Experimental da EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2023.....	15
Figura 5. A. Experimento pronto para ser desmontado; B. lavagens das raízes.....	16
Figura 6. A. Contagem dos nódulos; B. Pesagem dos nódulos.....	17
Quadro 1: Classificação das médias obtidas.....	18
Figura 7: Representação gráfica das médias do número de nódulos por planta soja com <i>Bradyrhizobium/Thichoderma</i>	19
Quadro 2: Classificação das médias obtidas	20
Figura 8: Representação gráfica das médias dos pesos, em gramas, dos nódulos por planta soja com <i>Bradyrhizobium/Thichoderma</i> , enfatizando em vermelho, a linhagem de maior e menor média de peso de nódulos.....	20

Quadro 3: Classificação das médias obtidas..... 21

Figura 9: Representação gráfica das médias dos pesos da massa seca, em gramas, das plantas *soja* com *Bradyrhizobium/Thichoderma*, enfatizando em vermelho, a linhagem de maior e menor média de peso..... 21

TESTE DE COMPATIBILIDADE DO *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* COM 24 LINHAGENS DE *TRICHODERMA SSP* NA SOJA (*Glycine max*)

COMPATIBILITY TEST OF *BRADYRHIZOBIUM* WITH 24 LINEAGES OF *TRICHODERMA* IN SOYBEAN (*Glycine max*)

Rodrigo Fernandes Sales

1 Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola Politécnica e de Artes, Goiânia, Goiás, GO, Brasil.

RESUMO

No cenário global, o Brasil assumiu a posição de líder na produção de soja, impulsionado pelo emprego de avançadas tecnologias, como os bioinsumos, que têm impulsionado a eficiência do cultivo. O trichoderma, um grupo de fungos, demonstra habilidade em conter o crescimento de agentes nocivos no solo, apresentando-se como uma alternativa segura e favorável ao meio ambiente. A soja desempenha um papel vital como fonte primária de proteína vegetal, e a relação simbiótica entre *Bradyrhizobium* e a soja desempenha um papel fundamental na fixação de nitrogênio, o que contribui significativamente para a sustentabilidade e continuidade desse cultivo. O objetivo principal do estudo é investigar a compatibilidade entre *Bradyrhizobium japonicum* e 24 Linhagens de *Trichoderma* na soja, verificando sua influência na formação de nódulos e na massa seca das plantas. O experimento foi conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás-GO, onde foi realizado um teste com soja tratada com *Bradyrhizobium* e diferentes Linhagens de *Trichoderma* em copos. A cepa 452 se destacou ao aumentar o peso e a quantidade de nódulos por planta, assim como a massa seca. A cepa 659 teve mais nódulos, enquanto a cepa 58 foi menos eficaz, com menor número e peso de nódulos por planta. Esperava-se um desempenho superior das cepas, mas os resultados podem estar relacionados a uma esterilização prévia do solo inadequada. Isso sugere a necessidade de continuar os estudos, aprimorando a técnica de esterilização para evitar competição entre espécies nativas e inoculantes.

Palavras-chave: Bioinoculadores; Fixação Biológica de Nitrogênio; Biocontroladores.

ABSTRACT

On the global stage, Brazil has assumed the position of leader in soybean production, driven by the use of advanced technologies, such as bioinputs, which have boosted cultivation efficiency. Trichoderma, a group of fungi, demonstrates the ability to contain the growth of harmful agents in the soil, presenting itself as a safe and environmentally friendly alternative. Soybeans play a vital role as a primary source of plant protein, and the symbiotic relationship between Bradyrhizobium and soybeans plays a key role in nitrogen fixation, which significantly contributes to the sustainability and continuity of this crop. The main objective of the study is to investigate the compatibility between Bradyrhizobium japonicum and 24 Trichoderma strains in soybeans, verifying their influence on the formation of nodules and the dry mass of the plants. The experiment was conducted at Embrapa Arroz e Feijão, in Santo Antônio de Goiás-GO, where a test was carried out with soybeans treated with Bradyrhizobium and different Trichoderma strains in cups. Strain 452 stood out by increasing the weight and number of nodules per plant, as well as dry mass. Strain 659 had more nodules, while strain 58 was less effective, with a lower number and weight of nodules per plant. Superior performance of the strains was expected, but the results may be related to inadequate prior sterilization of the soil. This suggests the need to continue studies, improving the sterilization technique to avoid competition between native species and inoculants.

Keywords: Bioinoculators; Biological Nitrogen Fixation; Biocontrollers.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine Max L.*) é oriunda do continente asiático, da região correspondente à China. Sua domesticação ocorreu durante o século XI a.C., constituindo nesta região seu centro de origem primário, com a maior variabilidade genética da cultura. Após eventos evolutivos, o ancestral *Glycine soja* deu origem à espécie *Glycine Max L.* Esta espécie foi espalhada através da migração nômade ao leste da China, região conhecida como a antiga Manchúria, e considerada hoje o centro de origem secundário (CAMARA,2011).

Conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento do Brasil (CONAB), a safra de soja no país, no ciclo 2022/2023, chegou a 154.605,9 milhões de toneladas, com a produção liderada pelo estado de Mato Grosso com uma produção de 58 milhões de toneladas, seguido pelo Paraná, com 41,5 milhões de toneladas, Rio Grande do Sul e Goiás produziram 33,5 milhões de toneladas e 22 milhões, respectivamente (CONAB, 2023a; CONAB, 2023b).

Uma das tecnologias que auxiliam no aumento da produtividade vegetal é a utilização dos bioinsumos, como a inoculação das sementes e solo com microrganismos. O gênero de fungos filamentosos, *Trichoderma*, faz parte da ordem Hypocreales e se destaca por sua habilidade de crescer rapidamente em uma variedade de materiais, além de sua capacidade de produzir enzimas que quebram ligações químicas. Dentro desse gênero, encontramos mais de 200 espécies que se distribuem por diversos ecossistemas, abrangendo desde solos, plantas, ambientes aquáticos, até locais marinhos e terrestres. (HARMAN *et al.*,2004).

O gênero *Trichoderma* é amplamente pesquisado em relação às suas aplicações no controle biológico de doenças em plantas e na promoção de seu crescimento. Além disso, esses fungos são seguros para o meio ambiente e para os seres humanos, uma vez que não produzem toxinas prejudiciais à saúde. Em um estudo recente publicado na revista "Applied Microbiology and Biotechnology", ficou evidenciado que o *Trichoderma* possui a capacidade de inibir o desenvolvimento de diversos patógenos do solo, como *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, entre outros, graças à sua produção de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas (HARMAN *et al.*,2004, HERMOSA *et al.*, 2013).

Como a soja demanda quantidades significativas de nitrogênio, busca alcançar níveis elevados de proteína. Sem a parceria simbiótica com *Bradyrhizobium*, o cultivo soja poderia se tornar impraticável devido aos altos custos que os agricultores enfrentariam ao utilizar fertilizantes (VARGAS; HUNGRIA, 1997 e ALCÂNTARA 2018).

É comum aplicar inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio, como a *Bradyrhizobium sp.*, junto às sementes de soja. Essa prática tem gerado resultados muito favoráveis do ponto de vista agrônomo, especialmente em solos onde a soja nunca foi cultivada ou em áreas com poucos anos de plantio dessa cultura. Com o passar do tempo e o cultivo contínuo de sementes de soja inoculadas, as bactérias rizóbias começam a colonizar o solo naturalmente. (MARENCO et al., 1993; ALCÂNTARA, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a compatibilidade do *Bradyrhizobium japonicum* com 24 Linhagens de *Trichoderma* ssp na soja, em casa de vegetação.

2.2 Específicos

- Verificar a compatibilidade do *Bradyrhizobium* com as seguintes Linhagens de *Trichoderma*: Tricodermil, 694, 659, 452, 011, 634, 658, 683, 700, 728, 610, 058, 730, 839, 630, 701, 777, 645, 170, 599, 657, 774, 768 e 808.
- Avaliar a influência da interação *Bradyrhizobium* e *Trichoderma* na quantidade de nódulos formados no período de 50 dias de cultivo.
- Avaliar a influência da interação *Bradyrhizobium* e *Trichoderma* na massa seca dos nódulos formados no período de 50 dias de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A crescente demanda mundial por alimentos mantém a soja como umas das principais fontes de proteína vegetal. Componente essencial na fabricação de rações animais e de importância cada vez maior na alimentação humana, a oleaginosa é a cultura agrícola que mais cresceu no Brasil nos últimos anos, chegando a aproximadamente 44.080 milhões de hectares, com área plantada de grãos no país (CONAB, 2023; COLUSSI et al., 2016; BIGOLIN et al., 2022). Com isso o Brasil passou a ser o maior produtor mundial do grão, com disponibilidade de diversas tecnologias de produção que permitem o aumento da produtividade.

Conhecida como um dos principais produtos agrícolas comercializados no mundo, desempenha um papel bastante fundamental na alimentação humana e animal, bem como, também na indústria de óleos vegetais e biodiesel (RODRIGUES et al., 2006). O Brasil, passou a ser o maior produtor da oleaginosa na safra de 2019/2020, com 42,0% da produção, sendo também o maior exportador mundial. Os principais mercados de destino são China, Espanha, Holanda, Irã e Tailândia. Cerca de 90% da produção de óleo vegetal e farelo proteico no Brasil são oriundos da soja. Isso significa que a indústria esmagadora brasileira é fortemente dependente dessa cultura, por ser a única oleaginosa produzida em escala no país (SILVA., 2010; PINHEIRO, et al., 2008; BIGOLIN et al., 2022).

A adaptabilidade da soja a diferentes climas e solos a torna uma cultura global. Sua resposta ao fotoperíodo é um dos principais fatores determinantes para sua produção. A soja é comum em variedades de dia curto, dia longo ou dia neutro, dependendo de como responde ao comprimento do dia. Essa flexibilidade em relação ao fotoperíodo permite que a soja seja cultivada em uma ampla faixa de latitudes, desde regiões tropicais até áreas temperadas (RODRIGUES et al., 2006)

A soja tem um grande destaque por sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* nas raízes, o que a torna uma fonte rica em proteína vegetal e uma cultura sustentável devido à sua capacidade de melhorar a fertilidade do solo (SILVA et al.,2010).

A relação dos microrganismos com os vegetais pode ser benéfica, quando promove o bom crescimento da planta, ou maléfica, quando se tornam patógenos. Entre

estes organismos se destacam as bactérias e fungos simbiotes (CARDOSO & ANDREOTE, 2016).

A fixação biológica de nitrogênio é umas das mais importantes simbioses de microrganismos e vegetais, é responsável pela incorporação de quantidades significativas de nitrogênio nos sistemas agrícolas. Isso não economiza apenas recursos, mas também tem implicações ambientais positivas, uma vez que uma aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados pode resultar em poluição da água e até emissões de gases de efeito estufa (HUNGRIA et al.,2007).

Essa associação simbiótica entre as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e as leguminosas exerce um papel importantíssimo na nutrição das plantas, fornecendo-lhes uma fonte significativa de nitrogênio. Além disso, a fixação biológica de nitrogênio por *Bradyrhizobium* pode reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para a redução dos custos de produção e minimização do impacto ambiental (HUNGRIA & VARGAS, 2000; FERNANDES et al., 2008).

Na prática agrícola da soja, como em muitas outras plantas cultivadas, a absorção de fertilizantes de nitrogênio tende a ser ineficiente, principalmente devido às perdas significativas por processos como lixiviação e volatilização. O nitrogênio é um elemento vital para o crescimento da soja, pois a planta retira cerca de 150 kg por hectare desse nutriente nos grãos. Uma abordagem mais eficaz para fornecer esse nutriente essencial é por meio da parceria simbiótica entre a soja e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 1994).

Segundo (FRED et al., 1932), as bactérias responsáveis pela nodulação na soja foram inicialmente agrupadas na espécie *Rhizobium japonicum*. Posteriormente, houve uma reclassificação para *Bradyrhizobium japonicum*, e mais adiante, essa categoria foi subdividida em *B. japonicum* e *B. elkanii*. No entanto, há uma considerável diversidade entre as cepas que realizam a nodulação na soja, tanto em relação à eficiência do processo simbiótico quanto à habilidade competitiva em relação às bactérias já presentes no solo. (JORDAN, 1982; KUYKENDALL et al., 1992).

Existem fungos que possuem um papel positivo para o desenvolvimento da planta, fungos que são benéficos para a planta (PEDRO et al., 2012; CARVAJAL et al., 2009).

Entre os fungos, o gênero *Trichoderma* é reconhecido como um dos mais proeminentes e eficazes biocontroladores de doenças de plantas. Seu papel como antagonista de patógenos de plantas é bem documentado, e várias espécies de *Trichoderma* têm a capacidade de suprimir uma ampla gama de doenças fúngicas. Além disso, o *Trichoderma* é conhecido por sua habilidade de promover o crescimento das plantas por meio da ativação de mecanismos de resistência sistêmica e promoção do desenvolvimento radicular. Esse efeito de melhoria do desenvolvimento das plantas por isolados de *Trichoderma* spp. foi descrita no feijão-comum (CARVAJAL *et al.*, 2009; PEDRO *et al.*, 2012).

Portanto, o *Trichoderma* é reconhecido como um aliado importante na agricultura sustentável, oferecendo soluções eficazes para o manejo de doenças e melhorias no desempenho das culturas (HARMAN *et al.*, 2004). *Trichoderma* produz mais de 250 produtos metabólicos além de produzirem enzimas que degradam a parede celular, peptídeos, metabólitos secundários e outras proteínas. A maior parte destes compostos bioativos tem a capacidade de afetar a resposta da planta a outros micróbios, assim melhorando os seus mecanismos de defesa, além de ao mesmo tempo estimularem o crescimento e desenvolvimento da planta, principalmente na parte da raiz (WOO & PEPE, 2018).

O gênero *Trichoderma* é um microrganismo constantemente presente na produção agrícola mundial. Já no Brasil o uso vem se destacando na pesquisa e na utilização comercial do *Trichoderma*, como controle biológico e na promoção de crescimento vegetal. A habilidade do gênero *Trichoderma* em controlar doenças de plantas foi descoberta em 1930 por Weindling, e com isso, vários estudos foram realizados para que possam demonstrar o potencial deste gênero no biocontrole. (LOBO-JUNIOR *et al.*, 2019, MEYER *et al.*, 2019). Efeitos simultâneos no controle biológico apareceu em diversas combinações de cepas, metabolitos, misturas de compostos bioativos que tem origem do *Trichoderma*, bem como de outros micróbios ou plantas, e com isso diversas possibilidades para o desenvolvimento de bioestimulantes vem surgindo (WOO & PEPE, 2018)

A utilização de fungos na cultura da soja pode trazer benefícios, tanto para o aumento na produção, quando na qualidade de grãos, além de auxiliar a planta para o controle de doenças e ajudando na absorção de nutrientes (PEDRO *et al.*, 2012;

CARVAJAL *et al.*, 2009). Também ocorre a produção de giberelinas e auxinas que favorecem o desenvolvimento de raízes e da área foliar, fazendo com que a planta suporte estresses abióticos e absorva melhor os nutrientes. Com a utilização de fungos na cultura da soja, diversos benefícios podem ser obtidos como redução com o custo de adubação, redução no uso de defensivos químicos, assim diminuindo os impactos ambientais, além de aumentar a produtividade (RODRIGUES, 2015., LOBO-JUNIOR *et al.*, 2019; MEYER *et al.*, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na unidade da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias em Santo Antônio de Goiás, no Estado de Goiás, denominada Embrapa Arroz e Feijão, localizada no endereço km 12 Zona Rural, rodovia GO-462. A parte experimental do projeto teve seu início em 5 de julho desde ano de 2023 se estendendo a outubro de 2023, na casa de vegetação da instituição (Figura 1).

Figura 1: Casa de vegetação na Embrapa/Arroz & Feijão, onde foram realizados os experimentos.



4.1 Delineamento do experimento

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), contendo 104 copos descartáveis, com capacidade de 500 ml, semeados três sementes Soja variedade “Perola” em cada copo, com solo autoclavado.

4.2 Preparo do solo e Autoclavação

O primeiro passo foi preparar o solo para o enchimento dos copos, utilizando terra de barranco (solo argiloso), mais uma parte de areia lavada. Após a preparação, encheu-se cinco sacos plásticos de vinte litros com a terra preparada que foram levados para autoclavação em laboratório.

Posteriormente, todos os sacos com solo autoclavados foram levados a casa de vegetação, com umidade e temperatura controlados, em respectivamente 30°C e 80% URar, e usados para o preenchimento uniforme dos copos para ser usado no experimento.

4.3 Inoculação das sementes de Soja

Para fazer a inoculação das sementes de Soja, foi utilizado o produto comercial Bioma Brady®, com recomendação de 240ml a cada 50 kg de sementes.

Foram pesados cerca de 0,150 kg de sementes, e após pesagem foi feita uma regra de três simples e chegou no valor de 0,7 ml para a inoculação das sementes.

Colocadas dentro de um saco plástico, a inoculação foi feita com auxílio de uma pipeta, após a secagem as sementes já estavam prontas para serem semeadas.

4.4 Preparo dos *Trichodermas* isolados

Para a preparação dos *trichodermas* que foram utilizados no experimento seguiu o protocolo definido por Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão, abaixo descrito.

4.4.1 Material utilizado

20 gramas de arroz parboilizado

25 ml água destilada; Erlenmeyer de 250 ml

5 discos micélio batata, dextrose, ágar (BDA) com *trichoderma* ssp. tomados da margem de uma colônia em crescimento.

4.4.2 Metodologia

a) Em cada frasco de 250 ml, foi colocado 20 gramas de arroz parboilizado e adicionar 25mL água purificada;

b) Foi submetido à esterilização em autoclave (121°C, 40 min);

c) Após autoclavação, foi agitado os frascos para desprender o arroz;

d) Esperei o esfriamento e adicionei 5 discos de BDA de 5 mm de diâmetro com micélio do isolado de *Trichoderma* spp., retirados da margem de uma colônia em crescimento.

e) Foi incubado à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, em estufa incubadora BOD, de cinco a sete dias, agitando os frascos diariamente;

4.4.3 Preparo de pó de esporos

a) Após período de incubação, em ambiente asséptico, foi transferido o conteúdo dos frascos para um saco de papel e promovido a secagem em estufa com circulação de ar forçado a temperatura de 30°C por no mínimo três dias ou até a secagem do material;

b) Após a secagem, foi triturado alguns segundos em liquidificador na velocidade mínima para desprendimento dos esporos do arroz e passado por uma peneira de 0,71 mm de abertura;

c) Foi acondicionado em saco plástico e armazenado em refrigerador sem congelar;

d) Opcionalmente, pode-se proceder a contagem dos conídios em câmara de Neubauer conforme descrito a seguir.

4.4.4 Preparo da suspensão de esporos

Após período de incubação, foi preparado uma suspensão de esporos adicionando-se uma quantidade de água estéril em cada frasco suficiente para promover a lavagem e o desprendimento dos esporos do arroz;

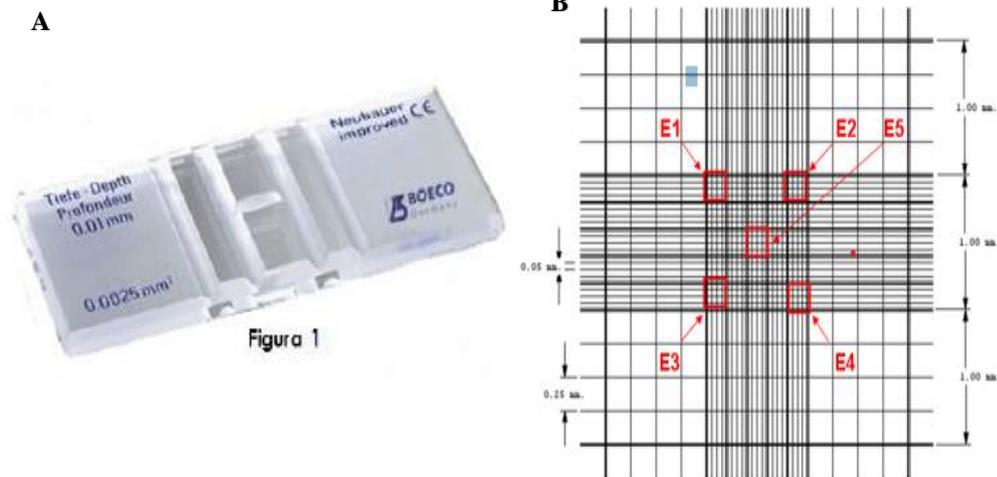
Transferir a suspensão de esporos para um frasco estéril filtrando em uma camada dupla de tecido crepe (filó) previamente autoclavado.

Fazer a contagem dos conídios nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer (Figura 2A), nos cinco quadrados (subcompartimentos) como os demarcados na Figura 2B), totalizando cinco contagens por campo da câmara de Neubauer (E1, E2, E3, E4 e E5).

Fórmula: $\text{Conídios/ml} = \{[(\text{Campo 1} + \text{Campo 2}) / 2] \times 5 \times 10^4\}$

Campo 1 = (E1+E2+E3+E4+E5) e Campo 2=(E1+E2+E3+E4+E5)

Figura 2 A e B: Localização do campo 1 e 2 na câmara de Neubauer(A); Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem de conídios de *Trichoderma* – E1, E2, E3, E4 e E5 (B).



A recomendações de uso de *Trichoderma* spp. é de $2,0 \times 10^{12}$ UFC (conídios) / Hectare $1,0 \times 10^{10}$ UFC (conídios) / kg semente.

Sendo a área dos copos utilizados no experimento de $0,08 \text{ m}^2$. Foram usados 5×10^6 conídios por ml, sendo utilizados 3 ml de cada suspensão por copo.

Figura 3: Suspensões das linhagens de *Trichoderma* utilizadas nos experimentos.



4.5 Semeadura

Foram semeadas três sementes de Soja já tratadas, da variedade “Perola” em cada copo com profundidade aproximadamente de um centímetro. Ao mesmo tempo já foi adicionado as dosagens de três ml dos respectivos *Trichodermas* que foram utilizados para a experimentação com auxílio de uma pipeta, conforme Figura 4.

Figura 4: Recipientes com as sementes da soja inoculada com *bradyrhizobium*, juntamente com aplicação das doses de *thichodermas* diretamente no solo.



Foram realizadas 4 repetições por linhagem de cada *Trichoderma*, 4 repetições com a semente de soja tratada com *Bradyrhizobium* sem inserção de *Trichodermas*, e, 4 repetições sem nenhuma inserção, apenas a semente de soja para tratamento testemunha, conforme Tabela 1).

Tabela 1- Delineamento do experimento da cultura da soja com o uso de *Trichodermas* associado ao *Bradyrhizobium japonicum*, do experimento conduzido na Área Experimental da EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2023.

Identificação	Repetição	Dosagem (ml)
Teste	4	0
Brady	4	0
Tricodermil	4	3
694	4	3
659	4	3
452	4	3
11	4	3
634	4	3
658	4	3
683	4	3
700	4	3
728	4	3
610	4	3
58	4	3
730	4	3
839	4	3
630	4	3
701	4	3
777	4	3
645	4	3
170	4	3
599	4	3
657	4	3
774	4	3
768	4	3
808	4	3

4.6 Desbaste

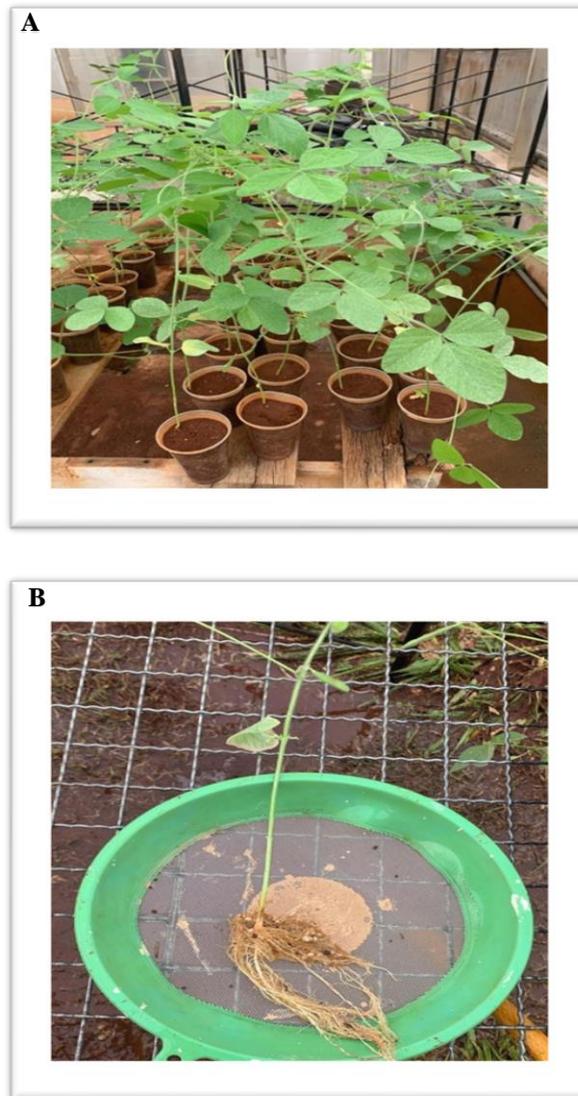
Depois de semeados as três sementes da Soja, esperou-se a germinação delas, para que depois de um período de dez dias fosse feito o desbaste de duas plantas e deixando apenas uma para o crescimento.

4.7 Desmonte do Experimento e Lavagem das Raízes

Após 50 dias depois de implantado, o experimento, foi desmontado dos copos e foi feita a lavagem das raízes com auxílio de uma peneira comum, juntamente com uma

mangueira e levados para laboratório em sacos de papel e colocados em estufa para secagem e depois contagem e pesagem dos nódulos (Figura 5 A e B).

Figura 5. **A.** Experimento pronto para ser desmontado; **B.** lavagens das raízes.



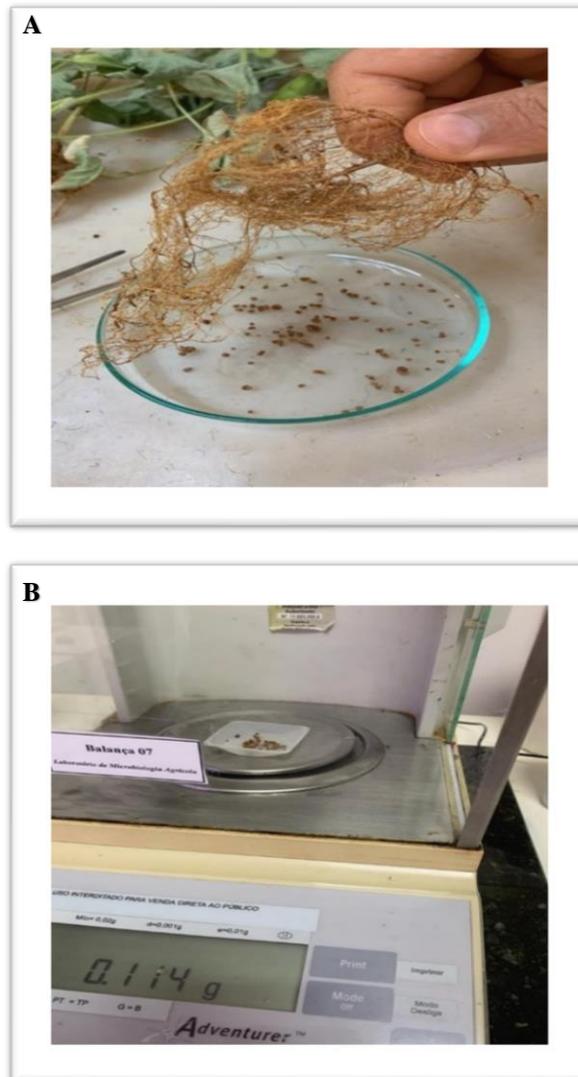
4.8 Contagem e Pesagem dos Nódulos

Após 50 dias de cultivo as plantas foram retiradas e lavadas e posteriormente colocadas em estufa a 30°C por um período de 3 dias. Em seguida realizou-se a contagem

e retirada dos nódulos das raízes com auxílio de uma pinça e colocados em placas de Petri.

Após contagem foi feita a pesagem em balança de precisão e anotação dos dados obtidos (Figura 6 A e B).

Figura 6. **A.** Contagem dos nódulos; **B.** Pesagem dos nódulos.



4.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos os testes de análise de variância a 5% (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após cultivo de 50 dias, em casa de vegetação com umidade e temperatura controlados, em respectivamente 30°C e 80% URar, visualmente as plantas apresentavam um crescimento homogêneo.

O desmonte do experimento se deu seguindo o seguinte protocolo: retirada da planta do recipiente; lavagem da raiz para retirada do solo aderido a ela; secagem das plantas em estufa; contagem do número de nódulos e posterior pesagem.

5.1 Quantidade dos nódulos presentes nas raízes das plantas

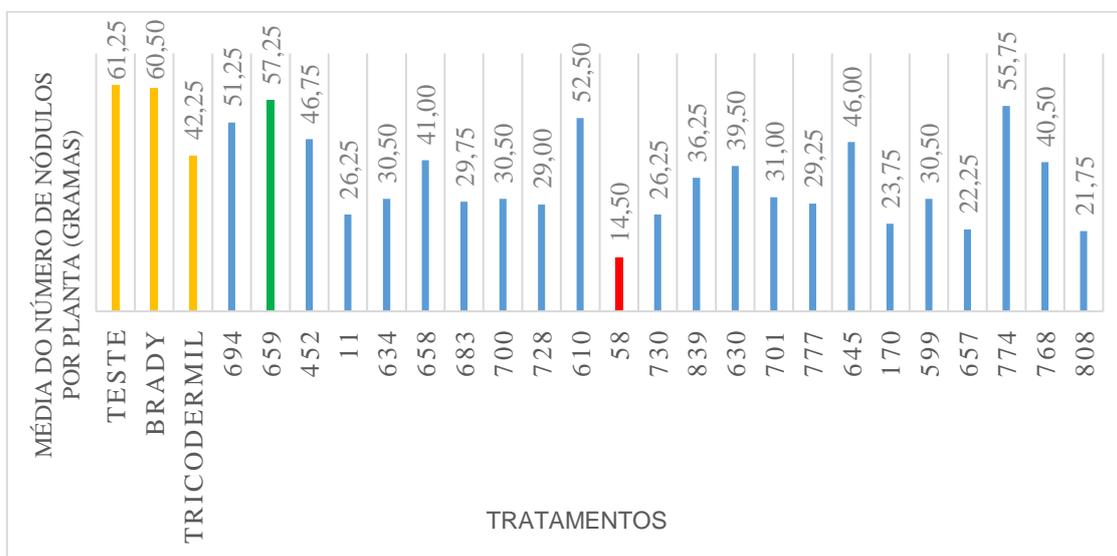
No presente estudo foram obtidos em média 35,3 nódulos (QUADRO 1) por planta independente da linhagem de *Trichoderma* utilizada, enquanto os controles Teste, Brady e Tricodermil obtiveram uma média de 61,25; 60,5 e 42,3 respectivamente, nódulos por planta, demonstrando uma grande diminuição da nodulação nos tratamentos (QUADRO 1).

Quadro 1: Classificação das médias obtidas.

Média do teste	61,3
Média do Brady	60,5
Média Tricodermil	42,3
Média entre os tratamentos	35,3

O tratamento que apresentou maior número de nódulos e mais se aproximou da testemunha foi o *trichoderma* 659, enquanto o *trichoderma* 58 apresentou menor média. (FIGURA 7).

Figura 7: Representação gráfica das médias do número de nódulos por planta soja com *Bradyrhizobium/Thichoderma*.



CADORE (2018), trabalhando com a associação de Soja/*Bradyrhizobium/Thichoderma*, encontrou uma interação positiva, que favorece o desenvolvimento inicial das plantas não corroborado nesse estudo e ALCÂNTARA (2018), que investigou o efeito da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* associado ou não ao *Bacillus subtilis*, através do tratamento de sementes encontrou resultados superiores na quantidade de nódulos, no comprimento da raiz, altura de planta e diâmetro do caule associado ou não ao *Bacillus subtilis* apresentando os melhores resultados entre os demais tratamentos avaliados, dados também não corroborados no presente estudo. Acredita-se que os dados discordantes encontrados neste estudo possam decorrer de uma esterilização do solo ineficiente, determinando uma competição dos inóculos com microrganismos nativos do solo, que já estavam adaptados as condições ecológicas.

5.2 Peso dos nódulos presentes nas raízes das plantas

Quando se analisou o peso seco dos nódulos, observou-se um peso médio de 0,10g por planta independente da linhagem de *Trichoderma* utilizada, enquanto os controles Teste, Brady e Tricodermil obtiveram uma média de 0,16g; 0,13g e 0,10g

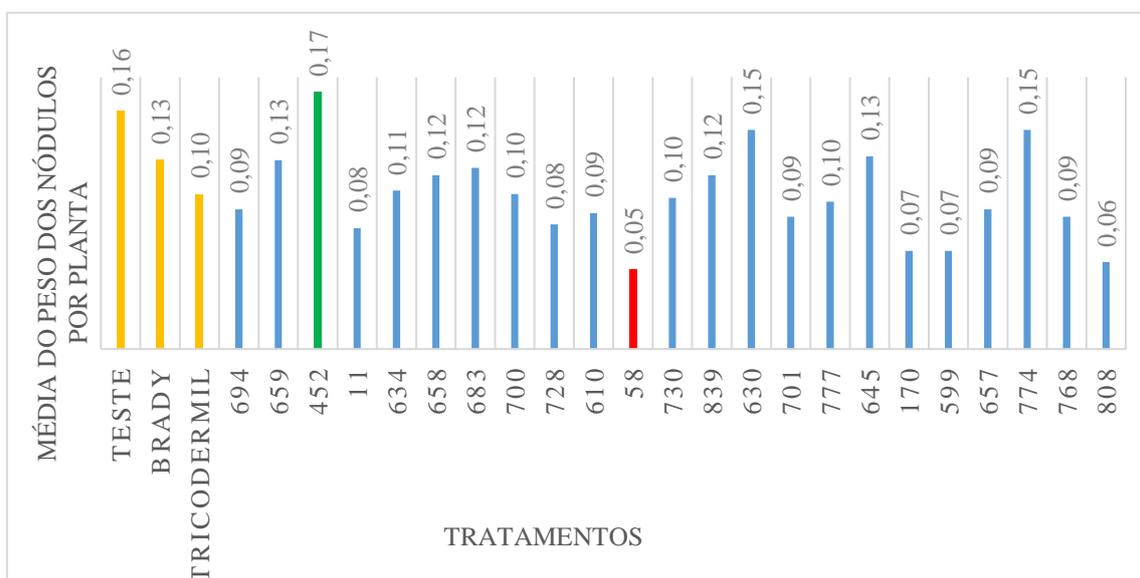
respectivamente, gramas de nódulos por plantas, demonstrando uma grande diminuição do peso médio dos nódulos nos tratamentos associados. (QUADRO 2).

Quadro 2: Classificação das médias obtidas.

Média do teste	0,16
Média do Brady	0,13
Média Tricodermil	0,10
Média entre os tratamentos	0,10

A cepa que apresentou maior média de peso de nódulos por planta, foi a 452, ultrapassando a média apresentada pela testemunha, já a 58 apresentou menor peso de nódulos por planta. (FIGURA 8).

Figura 8: Representação gráfica das médias dos pesos, em gramas, dos nódulos por planta soja com *Bradyrhizobium/Thichoderma*, enfatizando em vermelho, a linhagem de maior e menor média de peso de nódulos.



5.3 Peso da massa seca das plantas

Já para o peso da massa seca das plantas foram obtidos em média 8,20 gramas (QUADRO 3) por planta independente da linhagem de *Trichoderma* utilizada, enquanto

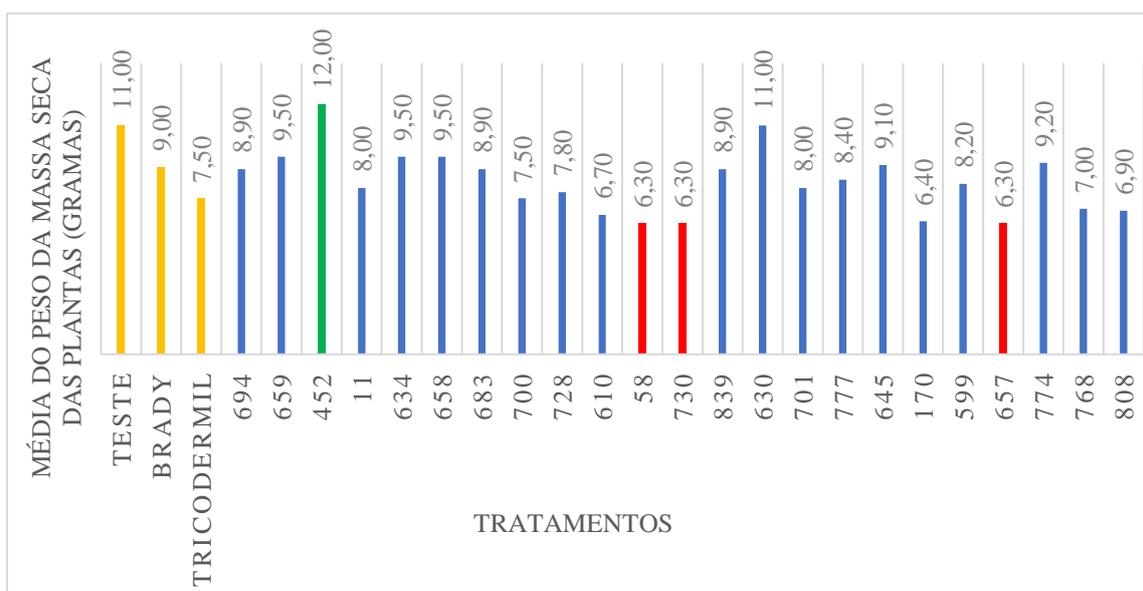
para os controles Teste e Brady obtiveram uma média de 11,0 e 9,0 gramas de massa seca por planta, demonstrando uma diminuição do peso da massa seca das plantas nos tratamentos. Mas quando comparado as médias entre os tratamentos, que foi de 8,20 gramas, houve um aumento no peso da massa seca das plantas em relação ao controle Tricodermil que teve a média de 7,50 gramas de massa seca. (QUADRO 3).

Quadro 3: Classificação das médias obtidas.

Média do teste	11,0
Média do Brady	9,0
Média Tricodermil	7,5
Média entre os tratamentos	8,20

A cepa que apresentou maior média de peso de massa seca foi a 452, em comparação com a testemunha. Já as cepas 58, 730 e 657 apresentaram menor peso. (FIGURA 9).

Figura 9: Representação gráfica das médias dos pesos da massa seca, em gramas, das plantas soja com *Bradyrhizobium/Thichoderma*, enfatizando em vermelho, a linhagem de maior e menor média de peso.



6. CONCLUSÃO

A cepa 452 foi a que mais se destacou, promovendo tanto maior peso de nódulos por planta quanto maior peso de massa seca. Enquanto a cepa 659 apresentou maior número de nódulos. Já a cepa 58 não foi tão eficaz nos parâmetros avaliados neste trabalho, apresentando menor número de nódulos, menor peso de nódulos por planta, além de menor peso.

Se esperava um destaque maior nas cepas utilizadas, como maiores promotoras dos parâmetros avaliados, porém, acredita-se que os resultados obtidos possam estar ligados a uma esterilização do solo, pré-inoculação, ineficiente. Diante disso, torna-se necessário que os estudos devam continuar. Melhorando a técnica de esterilização do solo para garantir que as espécies nativas tenham sido eliminadas e não entrem em competição com os inoculantes.

7. REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, R. I. *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* associados com *Bradyrhizobium japonicum* na promoção do crescimento da cultura da soja / Rafaela Israel Alcântara. – Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – Uni EVANGÉLICA, 2018.
- BIGOLIN, G., CONTI, A. F., BENNEDETTI, R., & HARTER, L. Influência do vigor de sementes no rendimento e qualidade fisiológica de sementes de soja. *Enciclopedia biosfera*, 19(40). 2022.
- CADORE, L. S. *Trichoderma e bradyrhizobium* no desenvolvimento e produtividade da soja. 2018. Dissertação (mestre em agrobiologia.) - universidade federal de santa maria centro de ciências naturais e exatas, Santa Maria-RS, 2018.
- CÂMARA, G. M. de S. Introdução ao agronegócio soja. In: CARRÃO-PANIZZI, M. C, 2011.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. MICROBIOLOGIA DO SOLO. 2ª Edição. Piracicaba: ESALQ, São Paulo, 2016.
- CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. BISSETT, J.. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.
- CONAB – Companhia Nacional de abastecimento. Acomp. safra brasileira de grãos, Brasília, DF, v.10 – Safra 2022/23, n.12 - Décimo segundo levantamento, p. 1-111, setembro 2023a.
- CONAB – Companhia Nacional de abastecimento. Acomp. safra brasileira de grãos, Brasília, DF, v.11 – Safra 2023/24, n.1 - Primeiro levantamento, p. 1-117, outubro 2023b.
- FERNANDES, Paulo; MASSENA REIS, Veronica. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosa. Fixação biológica de nitrogênio, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 200, p. 33, 2008.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants Madison: The University of Wisconsin Press, 343p. 1932

- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Espécies de *Trichoderma* - simbioses de plantas avirulentas e oportunistas. *Nature Reviews Microbiologia*, 2, 43-56, 2004.
- HERMOSA, R. M.; BELÉN RUBIO, ROSA, E.; CARDOZA, C. N., HENRIQUE MONTE; SANTIAGO G. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol*, v. 16, n. 2, p. 69-80, 2013.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. *Field Crop Research*, v. 65, p. 151–164, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). *Microrganismos de importância agrícola Brasília: Embrapa-SPI*, p.9-89. 1994.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; CARVALHO MENDES, I. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. *Documentos/Embrapa Soja*, ISSN 1516-781X; n.283)., Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados, p. 80, 2007.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriological*, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan, 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LOBO-JUNIOR, M; MACHADO-ROSA, T. A.; GERALDINE, A. M. Uso de *Trichoderma* na cultura do feijão-comum. *Trichoderma*, p. 393, 2019.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F.; MOSQUIM, P. R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.5, p.121-126, 1993.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. *Trichoderma: uso na agricultura*. [S. l.: s. n.], 2019.

PEDRO, E.; HARAKAVA, R.; LUCON, C. M. M. E. GUZZO; S. D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. Pesquisa Agropecuária brasileira, [s. l.], v.47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.

PINHEIRO, D. R.; PONTES, F. A.; BRAGA, J. A. L. S.; GONÇALVES, J. C. S.; PEREIRA, L. F. Tecnologia Do Óleo De Soja. Seminário Para Disciplina de Bioquímica Industrial, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

RODRIGUES, A. Uso de fungos na agricultura: Uma revisão com ênfase na aplicação em sistemas agroecológicos. Revista Ambientale, [s. l.], v. 15, n. 1, 2015.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A. D.; LHAMBY, J. C. B.; TEIXEIRA, M. C.; GUARESCHI, R. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na duração e na taxa de crescimento de grãos de soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 28p. html (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 35). 2006

SILVA, C. O.; ANDRADE, DANTAS, G. F. M. I. de S.; COSTA, N. M. B.; PELUZIO; M. do C. G.; FONTES, E. A. F.; MARTINO, H. S. D. da. Influência do processamento na qualidade proteica de novos cultivares de soja destinados à alimentação humana. Revista de Nutrição, v. 23, p. 389-397, 2010.

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

WOO, S. L.; PEPE, O. Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science, v. 9, p. 1801, 2018.

COLUSSI, J.; WEISS, C. R. ; SOUZA, Â. R. L. de ; OLIVEIRA, L. de. O agronegócio da soja: Uma análise da rentabilidade do cultivo da soja no Brasil. Espacios. Vol. 37 (Nº 16). Pág. 23. 2016