

Nodulação de variedades de soja transgênica

Diego de Oliveira Dapunicena^{1*}; Renato Cassol De Oliveira²

¹Acadêmico do Centro Universitário Assis Gurgacz – PR

²Biólogo. Doutor em Agronomia. Professor do Centro Universitário Assis Gurgacz – PR.

*diego.agriculturabrasil@hotmail.com

Resumo: A soja transgênica desde sua liberação e implantação no Brasil, sempre foi alvo de especulações, sobre quais e possíveis interferências, da inserção de tecnologias como RR (resistência a glifosato) poderia estar influenciando em características fisiológica e morfológica da planta. O trabalho teve por objetivo geral avaliar a nodulação de variedades de soja transgênica com tecnologia RR a partir do tratamento de sementes com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. O experimento foi conduzido na casa de vegetação, do Centro Universitário FAG, situado na cidade de Cascavel, PR. O delineamento utilizado foi um esquema fatorial 3x4, instalado em delineamento inteiramente ao acaso, com 3 variedades (NA5959 Ipro, BRS1010 Ipro, Brasmax GARRA Ipro) e 4 formas de inoculação (apenas com *Azospirillum*, apenas com *Bradyrhizobium*, co-inoculação *Azospirillum*+*Bradyrhizobium* e sem inoculação) resultando, 12 tratamentos com 4 repetições, totalizando 48 unidades experimentais. Foram avaliados a quantidade e peso de nódulos, comprimento de raiz e peso de massa verde das plantas. As variedades de soja transgênica NA5959 e BRS1010 não diferiram quanto a inoculação e co-inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio. A co-inoculação contribuiu com o desenvolvimento vegetativo e potencializou a nodulação.

Palavras-chave: Inoculação; *Bradyrhizobium*; *Azospirillum*; FBN.

Nodulation of transgenic soybean varieties

Abstract: Transgenic soybeans since their release and implantation in Brazil have always been the subject of speculation about the possible interferences of the insertion of technologies such as RR (glyphosate resistance) could be influencing the physiological and morphological characteristics of the plant. The objective of this work was to evaluate the nodulation of transgenic soybean varieties with RR technology from the treatment of seeds with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. The experiment was conducted in the greenhouse of the University Center FAG, located in the city of Cascavel, PR. The design was a 3x4 factorial scheme, installed in a completely randomized design with 3 varieties (NA5959 Ipro, BRS1010 Ipro, Brasmax GARRA Ipro) and 4 forms of inoculation (*Azospirillum* only, *Bradyrhizobium* only, *Azospirillum* + *Bradyrhizobium* co-inoculation and without inoculation), resulting in 12 treatments with 4 replicates, totaling 48 experimental units. The amount and weight of nodules, root length and green mass weight of the plants were evaluated. The transgenic soybean varieties NA5959 and BRS1010 did not differ regarding inoculation and co-inoculation of nitrogen-fixing bacteria. A co-inoculation contributed to the vegetative development and potentiated a nodulation.

Key words: Co-inoculation, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, BFN

Introdução

A produção de soja esta condicionada a uma oferta de nitrogênio que o solo não tem disponível e, é aportado durante o ciclo da cultura por microrganismos nitrificantes que fornecem esse elemento.

Estabelecer uma relação simbiótica entre planta e bactérias fixadoras de nitrogênio é de extrema importância, devido à capacidade destes microrganismos conseguirem

disponibilizar a quantidade suficiente de nitrogênio para o desenvolvimento da planta e conseqüentemente atingindo altas produtividades. Portanto, não havendo a necessidade de se fazer disponibilização de nitrogênio por fonte externa (BÖHMI e ROMBALDII, 2010).

De acordo com Zablutowicz e Reddy (2007), a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode disponibilizar de 65 a 160 kg N ha⁻¹ durante o cultivo da soja, o que pode representar até 100% do nitrogênio requerido por essa espécie.

Em função do advento das biotecnologias foi possível o desenvolvimento de cultivares de soja, tecnologia que permite a planta resistência ao glifosato (RR: Roundop Ready), contribuindo significativamente no controle de plantas daninhas em pós-emergência na cultura. Essa tecnologia se tornou adepta por vários produtores de soja, porém até o momento não foi realizado nenhum estudo no sentido de verificar se a implantação da tecnologia está interferindo sobre a fixação de nitrogênio na soja ou sobre a variabilidade de tolerância entre as variedades de soja com maior representatividade, ou seja, cultivares que tenham maior território de atuação (DVORANEN *et al.*, 2008).

Em território nacional o uso de sementes transgênicas vem dominando todo o mercado, abrangendo uma área de próximo a 49 milhões de hectares, desse total estão enquadradas as sementes de soja, milho (verão e inverno) e algodão. Dentre três culturas, a soja que se destaca com quase 100% de utilização de transgenia, representando 32,7 milhões de hectares, representando 96,5% da área plantada (CURY, 2016).

A soja geneticamente modificada (RR) que caracteriza resistência ao glifosato foi estabelecida após a inserção, em conjunto com a região t-DNA e o gene marcador de seleção correspondente a isoforma da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (E.C. 2.5.1.19, CP4 EPSPS) com peptídeo sinal da via chiquimato, resistente ao glifosato, fazendo com que a produção de aminoácidos aromático continue sendo feita normalmente (BÖHMI e ROMBALDIL, 2010).

O glifosato age na planta, de uma forma em que sua molécula faz o bloqueio da enzima 5-enolpiruvato-3-fostato sintase (EPSPS), que é extremamente importante para o seu desenvolvimento, por fazer parte da via de biossíntese de aromáticos essenciais. Quando essa enzima é bloqueada, essa biossíntese é interrompida, e devido à falta de aminoácidos a planta morre. E em uma planta com tecnologia RR que tem a presença da enzima cp4-epsps após o contato com o glifosato ele consegue se desenvolver normalmente, pois a molécula do herbicida não consegue bloqueá-la (PIONEER, 2014).

De acordo com estudos em laboratório, realizado por King et al. (2004), foi verificado que o glifosato tem efeito antagônico no desenvolvimento de microrganismo de solo, de suma importância para o desenvolvimento da soja, entre eles está o *Bradyrhizobium japonicum*, que é uma bactéria capaz de estabelecer uma relação simbiótica com a soja, fixando nitrogênio e o disponibilizando para o seu consumo. De acordo com ZABLOTOWICZ e REDDY (2007), a FBN pode disponibilizar de 65 a 160 kg N ha⁻¹ durante o cultivo da soja, o que pode representar até 100% do nitrogênio requerido por essa espécie.

De acordo Böhm e Rombaldii (2010) a aplicação de glifosato afeta de forma direta e indireta a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por causar danos diretos às bactérias simbiotes e, de forma indireta, comprometendo a fisiologia da planta ocasionando a redução do processo de fixação e absorção de nitrogênio.

Todavia, Bohm *et al* (2009).em resultados obtidos através de estudos em cultivares de soja geneticamente modificada e não modificada, verificou-se que a alteração genética introduzida na planta não condiciona alteração na FBN, na massa de nódulos e nem nos teores de nitrogênio, mas o uso de glifosato caracterizou redução na massa de nódulos.

Considerando os dados divergentes, verificados na literatura, esse trabalho teve por objetivo, avaliar a resposta de variedades de soja transgênica a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na casa de vegetação, no Centro Universitário FAG Cascavel, PR, situado nas coordenadas geográficas de latitude 24°57'24", longitude 53°35'37" e altitude de 720m. O experimento foi conduzido durante um intervalo de 60 dias, iniciando no dia 21 de outubro e finalizando no dia 18 de dezembro de 2017. As temperaturas durante o experimento variaram entre 12°C (mínima) e 28°C (máxima), com média de 23°C.

O delineamento utilizado foi um esquema fatorial 3x4, instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 variedades e 4 formas de inoculação, compondo 12 tratamentos com 4 repetições cada, totalizando 48 unidades experimentais (Tabela 1).

Tabela 1- Variedades de soja e suas respectivas combinações com os inoculantes compostos com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

Tratamentos	Variedades	Inoculações
1	Na5959 Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i>
2	Na5959 Ipro	Com <i>Azospirillum</i>
3	Na5959 Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>
4	Na5959 Ipro	Sem inoculação
5	Brs1010 Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i>
6	Brs1010 Ipro	Com <i>Azospirillum</i>
7	Brs1010 Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>

8	Brs1010 Ipro	Sem inoculação
9	Brasmax Garra Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i>
10	Brasmax Garra Ipro	Com <i>Azospirillum</i>
11	Brasmax Garra Ipro	Com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>
12	Brasmax Garra Ipro	Sem inoculação

Os tratamentos são representados por três variedades de soja transgênica com maior representatividade nas lavouras da região, sendo elas: BRS 1010 Ipro, Brasmax Garra Ipro, NA 5959 Ipro), com e sem aplicação de inoculantes para leguminosa MASTETFIX L Premier (SEMIA 5019 – *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 *Bradyrhizobium japonicum*) inoculantes para gramíneas MASTERFIX L Gramíneas (*Azospirillum brasiliensis* (estirpes abv5 e abv6, utilizados isoladamente ou combinados (co-inoculação) na dosagem recomendada pelos fabricantes.

Para a implantação do experimento em vasos, foi separado solo extraído a dois metros de profundidade ao qual foi acrescentado 10% de matéria orgânica e 20% de areia e, corrigido o pH com adição de calcário de acordo com a análise de solo realizada, homogeneizada e mantida em repouso por sete dias. Decorrido este período, o solo foi acondicionado nos vasos de 25 kg e transferido para a estufa, para a instalação do experimento.

O tratamento das sementes foi realizado de acordo com a dosagem recomendada pelo fabricante, sendo 2,5 e 1,5 mL Kg⁻¹, para o MASTERFIX L Premier e MASTERFIX L gramínea, respectivamente. Foi preparada uma solução do inoculante com água a 50%, para melhor distribuição sobre as sementes de soja. Na co-inoculação foi preparado uma solução contendo a soma das dosagens recomendadas.

Após inoculada, as sementes de cada variedade, foram cultivadas nos vasos (10 semente vaso⁻¹). Decorrido 30 dias, foi realizado o raleio, mantendo-se 4 planta no vaso e aplicado produto fitossanitário para controle de fungos (FOX: grupo químico grupos estrobilurina e triazolintiona, na dose 0,4 L ha⁻¹).

A manutenção da umidade foi realizada periodicamente com irrigação manual, e ao final do período de 60 dias foram realizadas as avaliações dos parâmetros. Os vasos foram abertos lateralmente e as plantas removidas cuidadosamente, alocadas sobre superfície plana lavadas com água corrente para remover solo adjacente aos nódulos. Para tanto, apenas 3 plantas de cada parcela foram submetida a avaliação. Em seguida Foi realizado a pesagem de massa verde, comprimento de raiz, quantificação e pesagem dos nódulos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com o auxílio do programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

Resultado e Discussão

O comprimento de raiz não foi estatisticamente significativo, quando considerado os tratamentos com inoculantes. Todavia, a massa verde das plantas, o número e peso de nódulos apresentaram diferença estatística, sendo o melhor tratamento com *Azospirillum*, seguido de Co-inoculação Brad. + Azos (Tabela 2).

Tabela 2 - Massa verde, comprimento de raiz, Número e peso de nódulos em função dos tratamentos com a inoculação da soja implantada em casa de vegetação no Centro universitário Assis Gurgacz. Cascavel, 2018.

Tratamentos	Massa verde (g pl ⁻¹)	Raiz (cm pl ⁻¹)	Nº Nod. (nº pl ⁻¹)	Peso Nod (mg pl ⁻¹)
<i>Bradyrhizobium</i>	19,85b	39,56a	7.27ab	26,03ab
<i>Azospirillum</i>	26,15a	41,40a	9.75a	39,36a
Co-inoc. Brad +Azos	25,82a	40,58a	8.09a	36,22a
Sem Inoculação	18,94b	37,60a	4.41b	15,80b
CV (%)	22,10	16.60	40,00	45,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A quantidade de massa verde se expressou superior quando foi inoculado com *Azospirillum* (26,15 g), seguido da Co-inoculação de Brad + Azos (25,85 g) e mostrando-se estatisticamente diferente onde foi inoculado com *Bradyrhizobium* e sem inoculação. O resultado de massa verde e seca não diferiu estatisticamente entre si, não ocorrendo correlação entre os tratamentos (Tabela 2). Porém, Gitti (2015) em estudo feitos com inoculação e co-inoculação no Estado do Mato Grosso do Sul, obteve dados diferentes ao presente trabalho. O referido autor, verificou ganhos significativos no quesito massa verde, quando foi utilizado bactérias fixadoras de nitrogênio em inoculação e co-inoculação.

Os resultados de comprimento de raiz apresentaram dados semelhantes entre os tratamentos. Contudo, onde se realizou a inoculação com *Azospirillum*, obteve-se melhor desenvolvimento. Comportamento esse condizente os relatados por Chibebeba (2015), no qual o autor verificou maior crescimento e número de pelos radiculares na raiz da soja, com inoculação de *Azospirillum* sp..

Os valores de nodulação foram maiores quando utilizado a inoculação com *Azospirillum* (9,75 nódulos), seguido da co-inoculação de Brad + Azos (8,09 nódulos) diferindo estatisticamente e sendo superior aos tratamentos restantes (inoculação com *Bradyrhizobium* e sem inoculação) (Tabela 2).

Resultados se assemelham aos encontrados por Nogueira et al. (2018), que conduziram estudos em 31 municípios no Estado do Paraná. Estes autores verificaram que na variável peso de nódulo, os tratamentos que demonstraram resultado de maior significância foram os inoculados com *Azospirillum* (39,36 mg⁻¹) seguido de Brad+Azos (36,22 mg⁻¹) e *Bradyrhizobium* (26,03 mg⁻¹). Resultados esses que são justificados por Gitti (2015) quando afirma através de pesquisa realizadas na cultura da soja, que a utilização de bactéria como *Azospirillum brasilense* resultaram em nódulos com maior massa em relação a outros tratamentos.

Quando considerado o desempenho das cultivares em relação ao tratamento com inoculantes, verificou-se que o melhor resultado foi obtido para NA5959 Ipro tanto para comprimento de raiz (41,82 cm) quanto número de nódulos (9,46), muito embora esta não tenha diferido estatisticamente da GARRA Ipro e BRS1010 Ipro, para as respectivas variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Desempenho das cultivares de soja transgênica quanto aos parâmetros avaliados sem casa de vegetação no Centro universitário Assis Gurgacz. Cascavel, 2018.

Cultivar	Massa verde (g pl ⁻¹)	Raiz (cm pl ⁻¹)	Nº Nod. (nº pl ⁻¹)	Peso Nod. (mg pl ⁻¹)	Nº Nod.
NA5959 Ipro	20,71a	41.82a	9.46a	38,19a	9.46a
GARRA Ipro	21,65a	41.71a	3.76b	13,16b	3.76b
BRS1010 Ipro	25,71a	35.88b	8.95a	36,71a	8.95a
CV (%)	22,10	16.60	40,00	45,00	43.02

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

O resultado de massa verde de planta não foi estatisticamente significativo, quando correlacionada com cultivares. Tal como constatado por Brandeleiro (2009) em pesquisas realizadas na Universidade Federal da Bahia em Cruz das Almas, BA. No qual o pesquisador verificou que as cultivares obtiveram desempenho semelhante entre si, eventualmente devido suas exíguas correlações.

Os resultados de comprimento de raiz se mostraram significativos, tendo a NA5959 Ipro com o maior valor nesse parâmetro (41,82 cm pl⁻¹), seguida da cultivar GARRA Ipro (41,71 cm pl⁻¹) o qual foi superior a cultivar BRS1010 Ipro com (35,88 cm pl⁻¹), (Tabela 3). Levando em consideração as cultivares e analisando-se suas características morfológicas em relação a ciclo e grupo de maturação, a cultivar BRS 1010 Ipro é a que mais se difere das demais, caracterizando-se como mais sensível ao fotoperíodo negativo. Possivelmente este fator tenha influenciado nos resultados já que durante a condução do experimento, a maior

parte dos dias permaneceu nublado ou parcialmente ocasionando uma baixa intensidade de luz. Segundo Decicino (2014) algumas variedades apresentam maior sensibilidade ao fotoperíodo negativo, podendo resultar em plantas com estruturas morfológicas reduzidas como o sistema radicular, interferindo na formação de nódulos.

Considerando o peso de nódulo os resultados se mostraram significantes, tendo a cultivar NA5959 Ipro com comportamento superior 38,19 mg pl^{-1} , seguida da cultivar BRS1010 Ipro com 36,71 mg pl^{-1} e com desempenho inferior as cultivares anteriores e para a cultivar GARRA IPRO com 13,16 mg pl^{-1} . Bohrer e Hungria (1998) destacam que a variabilidade entre cultivares, quanto a peso de nódulos, pode estar relacionada a aspectos genéticos intrínsecos da planta.

Em relação à nodulação, a cultivar 5959 Ipro foi superior a BRS1010 Ipro, com 9,46 e 8,95 nódulos pl^{-1} , respectivamente. Já a cultivar GARRA Ipro apresentou 3,76 nódulos pl^{-1} , demonstrando uma performance inferior as outras citadas anteriormente. Estes valores estão bem abaixo dos relatados por Hungria *et al.* (2013), que em seus trabalhos obtiveram 42 nódulos por planta.

Conclusão

As variedades de soja transgênica NA5959 e BRS1010 não diferiram quanto a inoculação e co-inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio. A co-inoculação contribuiu com o desenvolvimento vegetativo e potencializou a nodulação.

Referências

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 937-953, jun. 1998.

BÖHM, G.M.B.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, v.40, n. 1, p. 213-221, 2010.

BOHM, G.M.B. et al. Glyphosate- and imazethapyr-induced effects on yield, nodule mass and biological nitrogen fixation in field-grown glyphosate-resistant soybean. **Soil Biology e Biochemistry**, v.41, n.2, p.420-422, 2009.

BRANDELERO. M. B.; PEIXOTO. P. P.; RALISCH, R.; Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 581-588, 2009.

CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M.F.; BRITO, O.R.; ARAUJO, R.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, p.1641-1649, 2015.

CURY, A., **Transgênicos são 93% da área plantada com soja, milho e algodão**. 2016. Disponível em: < http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2016/08/trans_genicos-as-o-93-da-area-plantada-com-soja-milho-e-algodao.html>. Acesso em: 23 mar. 2018.

DECICINO, T.; A importância do posicionamento de cultivares de soja para o sucesso da cultura. **Technology development**, Monsoy 2015. Disponível em: http://www.monsoy.com.br/site/wp-content/uploads/2016/08/job_02_97_informativo_s_tecnico_s4_an04_n9_ok_atualizado_ok.pdf. Acesso em 02 set. 2018.

DUKE, S.O. Glyphosate. In: KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. **Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action**. 1998. p.1-70.

DuPont Pioneer. Biotecnologia, **Tolerante ao glifosato**. 2014 Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/biotecnologia/tolerante-ao-glifosato>>. Acesso em 20 mar. 2018

DVORANEN, E.C. et al. Nodulação e crescimento de variedades de soja RR sob aplicação de glyphosate, fluazifop-p-butyl e fomesafen. **Planta Daninha**, v.26, n. 3, p. 619-625, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: Guia para os procedimentos do Bootstrap em várias comparações. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, 2014.

GITTI, D. C. **Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja**. Fundação MS, Maracaju, MS, 2016. Disponível em: http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/234/234/newarc_hive-234.pdf. Acesso em: 01 set. 2018.

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

KING, C.A. et al. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, v.93, p.79-186, 2001.

NOGUEIRA, M. A.; PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; DE LIMA, D.; CONTE, O.; HARGER, N.; DE OLIVEIRA, F. T.; HUNGRIA, M.; **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja nasafrá 2017/18 no estado do Paraná**. Londrina: Embrapa soja (CIRCULAR TÉCNICA 143), 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1095314>. Acesso em: 25 set 2018.