

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Jessica Deolinda Leivas Stecca

**CO-INOCULAÇÃO, OSMOPROTEÇÃO E APLICAÇÃO DE COBALTO
E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA**

Santa Maria, RS, Brasil
2020

Jessica Deolinda Leivas Stecca

**CO-INOCULAÇÃO, OSMOPROTEÇÃO E APLICAÇÃO DE COBALTO E
MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada ao Curso de Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Agronomia**

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

Santa Maria, RS, Brasil.
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Stecca, Jessica Deolinda Leivas
CO-INOCULAÇÃO, OSMOPROTEÇÃO E APLICAÇÃO DE COBALTO E
MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA / Jessica Deolinda Leivas
Stecca.- 2020.
97 p.; 30 cm

Orientador: Thomas Newton Martin
Coorientadores: Alessandro Dal'Col Lúcio, Luciane
Almeri Tabaldi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2020

1. Glycine max (L.) Merrill 2. Fixação biológica de
nitrogênio 3. Micronutrientes 4. Correlações canônicas I.
Martin, Thomas Newton II. Lúcio, Alessandro Dal'Col
III. Tabaldi, Luciane Almeri IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JESSICA DEOLINDA LEIVAS STECCA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Jessica Deolinda Leivas Stecca

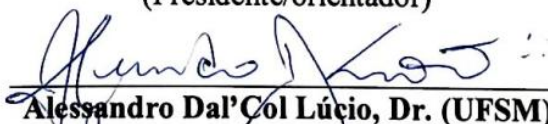
**CO-INOCULAÇÃO, OSMOPROTEÇÃO E APLICAÇÃO DE COBALTO E
MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração em Produção
Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para a
obtenção do título de **Doutora em Agronomia**

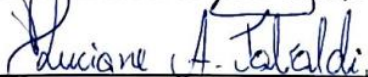
Aprovada em 06 de março de 2020:



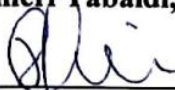
Thomas Newton Martin, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)



Alessandro Dal'Col Lúcio, Dr. (UFSM)



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)



Gerusa Massuquini Conceição, Dra. (UNIJUÍ)



Francisco Javier López Baena, Dr. (US) - Videoconferência

Santa Maria, RS, Brasil.

2020

DEDICO

A meus pais José Lourenço e Vera Lúcia, e minha tia Maria por contribuírem na minha formação como pessoa, por me apoiarem nas minhas decisões e me orientarem sempre a seguir o caminho do bem.

Acredito que a família forma o caráter do indivíduo e vocês sem dúvida ajudaram a construir muito bem o meu, são meus maiores exemplos.

Obrigada por tudo que vocês têm feito e ainda farão por mim.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pois sem ele nada disso seria possível. Obrigada pela vida, família e amigos que me destes.

À Universidade Federal de Santa Maria, mais especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Thomas Newton Martin pela orientação, ensinamentos, amizade, compreensão para a realização deste trabalho.

Aos Professores Alessandro Dal'Col Lúcio e Luciane Almeri Tabaldi pela paciência e dedicação para realizarmos o trabalho proposto.

Aos queridos amigos e colegas da Pós-Graduação (“Só nós da Pós”): Evandro, Glauber, Giovane, Matheus, Rosana, Joanei e Dionatas pela colaboração nas atividades, parceria, amizade e dias de descontração.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Grandes Culturas de Coxilha, em especial ao Pedro e Lucas, “meus estagiários”.

As minhas amigas queridas Tânia, Elisa, Lucielle, Laís, Delizara, Jéssica e Greice pelas conversas, conselhos, ajudas e momentos de descontração que compartilhamos. Vocês são as melhores amigas que alguém poderia ter.

Muito obrigada!

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

RESUMO

CO-INOCULAÇÃO, OSMOPROTEÇÃO E APLICAÇÃO DE COBALTO E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA

AUTORA: Jessica Deolinda Leivas Stecca

ORIENTADOR: Thomas Newton Martin

A produtividade das culturas está fortemente relacionada à nutrição de plantas. Na soja, o nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade, estando envolvido em processos de crescimento e desenvolvimento da cultura. No Brasil, a disponibilidade de N para a soja ocorre pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) que depende do processo de inoculação com bactérias. Contudo, a eficiência do processo está sujeita a diversos fatores como o tratamento de sementes (TS), que pode reduzir a sobrevivência de bactérias inoculadas, e disponibilidade de nutrientes. Neste contexto, objetivou-se avaliar a utilização de um osmoprotetor entre a co-inoculação e a aplicação de Cobalto (Co) e Molibdênio (Mo) via TS, e seus efeitos sobre a nodulação, componentes de produtividade, teor de proteínas nos grãos, alterações enzimáticas nas plantas e a qualidade de sementes de soja da próxima geração. Foram conduzidos experimentos com as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. O delineamento experimental envolveu um bifatorial (2 x 3) + 1, com quatro e três repetições, constituído por utilização ou não do osmoprotetor; aplicação de Co e Mo nas sementes, foliar ou sem aplicação; e testemunha adicional (sementes com fungicida e inseticida). No capítulo I, avaliou-se o desempenho das plantas no campo e o teor de proteína dos grãos. No capítulo II com as folhas provenientes das plantas do experimento de campo foram avaliadas as alterações enzimáticas e, das sementes, foi avaliada a sua qualidade. No capítulo III realizou-se a análise de correlações canônicas entre os caracteres da planta (massa e número de nódulos, massa seca de parte aérea, número de legumes, massa de mil grãos e produtividade de grãos) e da semente (comprimento de parte aérea e raiz, massa seca de plântula, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, vigor e germinação); variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão e na folha, carotenóides e atividade da enzima guaiacol peroxidase) e o grupo de variáveis da planta; e fisiológicas e de semente; e dentro de cada grupo de caracteres a correlação linear de Pearson. Os principais resultados obtidos foram: o osmoprotetor juntamente ao tratamento químico de sementes reduz a massa seca de nódulos, massa de mil grãos, número de legumes e produtividade de grãos (PG); a co-inoculação anual das sementes promove acréscimos na PG e mantém a qualidade fisiológica das sementes colhidas; a co-inoculação aumenta o teor de proteína das folhas e dos grãos; a utilização da co-inoculação associado ao Co e Mo aumentam a PG; a análise de correlações canônicas mostra que os grupos de variáveis da planta, das sementes e fisiológicas não são independentes, definindo as características que devem ser priorizadas nas avaliações, sendo dependentes da cultivar avaliada. Assim, conclui-se que a co-inoculação associada a aplicação de Co e Mo é uma tecnologia que contribui para o aumento na produtividade de grãos, na qualidade de sementes da próxima geração e no teor de proteínas do grão da cultura da soja, sem ocasionar danos ambientais e com custo de produção relativamente baixo.

Palavras - chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Fixação biológica de nitrogênio. Micronutrientes. Correlações canônicas.

ABSTRACT

CO-INOCULATION, OSMOPROTECTION AND APPLICATION OF COBALT AND MOLIBDENIUM IN SOYBEAN CULTURE

AUTHOR: JESSICA DEOLINDA LEIVAS STECCA
ADVISOR: THOMAS NEWTON MARTIN

Crop productivity is strongly related to plant nutrition. In soybean, nitrogen (N) is the nutrient required in greater quantity, being involved in growth and development processes of the crop. In Brazil, the availability of N for soybeans occurs through biological nitrogen fixation (FBN), which depends on the inoculation process with bacteria. However, the efficiency of the process is subject to several factors such as seed treatment (TS), which can reduce the survival of inoculated bacteria, and availability of nutrients. In this context, the objective was to evaluate the use of an osmoprotector between co-inoculation and the application of Cobalt (Co) and Molybdenum (Mo) via TS, and its effects on nodulation, yield components, protein content in the grains, enzymatic changes in plants and the quality of next generation soybean seeds. Experiments were conducted with the cultivars NS 5959 IPRO and TMG 7062 INTACTA. The experimental design involved a bifactorial (2 x 3) + 1, with four and three repetitions, consisting of using or not the osmoprotector; application of Co and Mo in the seeds, leaf or without application; and additional control (seeds with fungicide and insecticide). In chapter I, the performance of plants in the field and the protein content of the grains were evaluated. In chapter II with the leaves from the plants of the field experiment, the enzymatic changes were evaluated and, from the seeds, their quality was evaluated. In chapter III, the analysis of canonical correlations between the characters of the plant (mass and number of nodules, dry mass of aerial part, number of pods, mass of a thousand grains and grain yield) and seed (length of aerial part and root, seedling dry mass, accelerated aging, electrical conductivity, first count and germination); physiological variables (protein content in the grain and leaf, carotenoids and activity of the guaiacol peroxidase enzyme) and the group of plant variables; and physiological and seed; and within each character group the Pearson linear correlation. The main results obtained were: the osmoprotector together with the chemical treatment of seeds reduces the dry mass of nodules, mass of a thousand grains, number of pods and grain yield (PG); annual seed co-inoculation promotes increases in PG and maintains the physiological quality of the harvested seeds; co-inoculation increases the protein content of leaves and grains; the use of co-inoculation associated with Co and Mo increase PG; the analysis of canonical correlations shows that the groups of variables of plant, seed and physiological are not independent, defining the characteristics that should be prioritized in the evaluations, being dependent on the evaluated cultivar. Thus, it is concluded that the co-inoculation associated with the application of Co and Mo is a technology that contributes to the increase in grain productivity, in the quality of next generation seeds and in the protein content of the soybean grain, without cause environmental damage and relatively low production cost.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. Biological nitrogen fixation. Micronutrients. Canonical correlations.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 - Distribuição das precipitações pluviométricas (mm) e temperaturas médias (°C) em decêndios, dos meses de novembro e dezembro de 2017 e janeiro, fevereiro, março e abril de 2018 para o município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Semeadura: safra 2017/2018 em 28/11/2017 e safra 2018/2019 em 06/11/2018 (SM), florescimento: safra 2017/2018 em 15/02/2018 e safra 2018/2019 em 16/01/2019 (FL) e colheita: safra 2017/2018 em 12/04/2018 e safra 2018/2019 em 25/03/2018 (CO). 48

ARTIGO 2

Figura 1 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), massa seca de plântula (MS, mg) e condutividade elétrica (CE, $M^{-1} cm^{-1} g^{-1}$) pela aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo na cultivar NS 5959 IPRO... 61

Figura 2 - Envelhecimento acelerado (EA, %) e vigor de sementes (VG, %) em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar TMG 7062 INTACTA. 63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA para safra 2017/2018, representada pelos quadrados médios das variáveis número de nódulos (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e teor de proteína bruta nos grãos de soja (PB)..... 41
- Tabela 2 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA para safra 2018/2019, representada pelos quadrados médios das variáveis número de nódulos (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e teor de proteína bruta nos grãos de soja (PB)..... 42
- Tabela 3 - Massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) em função do em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar TMG 7062 INTACTA, safra 2017/2018..... 43
- Tabela 4 - Massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta⁻¹), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), proteína bruta no grão (PB, %) e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹) em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar NS 5959 IPRO, safra 2017/2018. 44
- Tabela 5 - Número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) para a cultivar NS 5959 IPRO, e massa de mil grãos (MMG, g) e proteína bruta no grão (PB, %) para a TMG 7062 INTACTA em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo, safra 2018/2019..... 45
- Tabela 6 - Custo total de produção, produtividade de grãos (PG, sacos ha⁻¹), receita bruta (RB, R\$ ha⁻¹), receita líquida (RL, R\$ ha⁻¹) e ganho líquido em relação à testemunha (GL, R\$ ha⁻¹) da cultura da soja em função dos tratamentos..... 46
- Tabela 7 - Populações de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* e *Azospirillum sp.* por grama de solo (UFC g⁻¹ solo) na área de condução do experimento em 2018 e 2019..... 47

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Caracterização das sementes: Umidade (U, %), massa de mil grãos (MMG, g), teor de proteína bruta (PB, %) e óleo (ÓLEO, %) das sementes provenientes dos tratamentos de campo em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA..... 55
- Tabela 2 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, representada pelos quadrados médios das variáveis explicativas comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), massa seca de plântula (MS, mg), envelhecimento acelerado (EA, %), condutividade elétrica (CE, M⁻¹ cm⁻¹ g⁻¹), vigor (VG, %) e germinação (GE, %) 58
- Tabela 3 - Populações de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* e *Azospirillum sp.* por grama de solo (UFC g⁻¹ solo) na área de condução do experimento em 2018..... 60
- Tabela 4 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, representada pelos quadrados médios das variáveis explicativas: teor de proteína (mg ml⁻¹), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD, U mg⁻¹

¹proteína), teor total de clorofila (Chl Total, mgg^{-1} FW) e teor de carotenóides (mgg^{-1} FW)..... 64

ARTIGO 3

- Tabela 1 - Correlação linear de Pearson entre variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG)), da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) e fisiológicas (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) para as cultivares NS 5959IPRO e TMG 7062 INTACTA. 80
- Tabela 2 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG) e o grupo de variáveis da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. 81
- Tabela 3 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) e o grupo de variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. 82
- Tabela 4 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) e o grupo de variáveis da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062. 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	14
2.2 CO-INOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA	16
2.3 COBALTO E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA	17
2.4 OSMOPROTETORES	18
3 ARTIGO 1 - OSMOPROTEÇÃO, COBALTO, MOLIBDÊNIO E CO-INOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA	20
4 ARTIGO 2 – CO-INOCULAÇÃO, COBALTO E MOLIBDÊNIO BENEFICIAM A QUALIDADE DE SEMENTES DE SOJA	49
5 ARTIGO 3 - RELAÇÕES ENTRE CARACTERES DA PLANTA, DA SEMENTE E FISIOLÓGICAS NA CULTURA DA SOJA	73
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A soja é a oleaginosa mais cultivada mundialmente pelas características dos seus grãos, que são utilizados na alimentação humana, animal e na indústria de biocombustíveis. A demanda pelo grão vem aumentando visto a população estimada de 9,7 bilhões de habitantes até o ano de 2050 (UNITED NATIONS, 2019). Contudo, atender a essa crescente demanda é um problema se as tendências da produção agrícola são insuficientes e as áreas para expansão do cultivo são limitadas.

O Brasil possui destaque nesse cenário, pois a produção do grão para a safra 2019/2020 pode ultrapassar os Estados Unidos, tornando-se o principal produtor mundial de soja (USDA, 2020). Atribui-se essa colocação ao aumento da produtividade pelos avanços tecnológicos e inovações nos sistemas de produção.

Nesse contexto, a utilização de sementes de qualidade é uma necessidade para o estabelecimento adequado e uniforme de plântulas na lavoura, pois é o primeiro componente de produtividade a ser definido. Ainda segundo Conceição et al. (2018) até os 10 dias de vida das plântulas as reservas para o crescimento e desenvolvimento são provenientes das sementes. Portanto sendo necessário que as plantas tenham durante todo o seu ciclo condições ideais para originar sementes com alta qualidade.

No Brasil, a produtividade média de grãos estimada para a safra 2019/2020 ainda é baixa, podendo chegar a aproximadamente 3322 kg ha⁻¹ (CONAB, 2020). Por conseguinte, são necessárias tecnologias que visem o aumento de produtividade de grãos da cultura e com menores impactos ao meio ambiente. No Brasil, a utilização de tecnologias sustentáveis são utilizadas, como é o caso da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que são capazes de fornecer até 94% do nitrogênio (N) necessário para o crescimento e desenvolvimento da soja (HUNGRIA et al., 2005). Outras bactérias também são estudadas na cultura, como o *Azospirillum* que é utilizado no processo de co-inoculação juntamente com o *Bradyrhizobium*. O *Azospirillum* além de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN), produz fitohormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, induz a resistência a doenças e estresses ambientais, e solubiliza fosfato que auxiliam no crescimento e desenvolvimento das plantas. Contudo, para a realização eficiente da FBN pelas bactérias alguns nutrientes são necessários como é o caso do cobalto (Co) e molibdênio (Mo).

A disponibilidade do N em forma assimilável pela planta ocorre por meio da enzima nitrogênase presente em ambas as bactérias. O Mo faz parte dessa enzima na forma de Fe-Mo

proteína, recebendo os elétrons da Fe-proteína e ligando-se ao N₂, fazendo com que ocorra a quebra da ligação tripla do N₂ e o tornando disponível para a assimilação da planta. Já o Co determina a atividade dos nódulos, pois faz parte da estrutura das vitaminas B12, sendo importante na formação da co-enzima cobalamida que é precursora da legmoglobina. Esses micronutrientes fazem parte das indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul (SALVADORI et al., 2016). Porém, agricultores ainda deixam de realizá-la, por desconhecimento dos benefícios do Co e do Mo e/ou por incerteza da compatibilidade das bactérias presentes na inoculação com os nutrientes.

Por serem as sementes preconizadas como veículo de tecnologias de proteção e nutrição de plantas, produtos são aplicados via tratamento de sementes devido ao menor custo e facilidade de operação. Desta forma, tecnologias são estudadas com intuito de proporcionar melhorias no processo de FBN, como é o caso da aplicação de osmoprotetores entre aplicação dos nutrientes e a inoculação de modo a evitar o contato direto entre os produtos. Os osmoprotetores proporcionam a formação de uma “película” na superfície da semente impedindo o contato direto do inoculante com o tratamento de sementes, disponibilizam substâncias sinalizadoras que beneficiam a comunicação entre as bactérias e as raízes da planta, além de fornecerem substratos que servem de alimento para as bactérias. Portanto, viabilizam maior sobrevivência, maior a infecção pelas bactérias nas raízes, maior produtividade e qualidade fisiológicas de sementes das plantas.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a utilização de um osmoprotetor entre a co-inoculação e a aplicação de Cobalto (Co) e Molibdênio (Mo) via TS e seus efeitos sobre a nodulação, componentes de produtividade, teor de proteína nos grãos, alterações enzimáticas nas plantas e a qualidade de sementes de soja da próxima geração.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A nutrição de plantas é um dos fatores principais na obtenção de altas produtividades de grãos, representando um percentual significativo nos custos de produção da lavoura. Dentre os nutrientes requeridos em maior quantidade para desenvolvimento e crescimento da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) está o nitrogênio (N). Esse é obtido da simbiose

realizada entre a planta e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O requerimento de N na soja é alto devido ao elevado teor de proteína na composição dos seus grãos de aproximadamente 40% (SILVA et al., 2006). Estima-se que para produzir 1.000 kg de grãos de soja são necessários 80 kg de N (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007), o que implicaria em altos custos de produção pela utilização de fertilizantes nitrogenados.

Contudo, a planta de soja é capaz de realizar uma associação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, denominada simbiose. As bactérias realizam o processo de FBN, o qual pode disponibilizar até 94% do N total necessário para o desenvolvimento da cultura, garantindo ganhos econômicos pela não utilização de fertilizantes nitrogenados, os quais implicariam em gastos em torno de US\$ 15 bilhões de dólares a cada safra (HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA; MENDES, 2015). Vale ressaltar também os danos ambientais pela utilização dos fertilizantes nitrogenados vista a eficiência de utilização pelas plantas que é de apenas 50% do que são aplicados sendo necessários 33 milhões de toneladas de uréia.

No Brasil, as estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas e que possuem maior eficiência na FBN, para a cultura da soja, são *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5009) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) (CÂMARA, 2014). Porém, por não serem nativas em solos brasileiros é necessário realizar a inoculação das sementes da cultura, principalmente em solos onde nunca receberam inoculantes. Depois de inoculadas e semeadas, ocorre a germinação dessas sementes e as raízes da planta passam a exsudar algumas moléculas, principalmente flavonóides, que possuem a função de atrair os rizóbios inoculados, estimular o crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e ativar diversos genes da bactéria responsáveis pelo início da nodulação (DESBROSSES; STOUGAARD, 2011). Esses genes são denominados fatores *Nod* e dão início ao processo de infecção das raízes, onde primeiramente ocorre encurvamento da parede celular dos pêlos colonizados dando origem a um cordão de infecção no qual as bactérias continuam sua multiplicação. O cordão adentra as células epidérmicas da raiz, infeccionando-as podendo atingir o endoderma ou até mesmo o periciclo da raiz. A presença dos cordões no parênquima cortical da raiz faz com que células tetraplóides se multipliquem dando a origem aos primórdios do nódulo, os quais sofrem a ação dos hormônios auxinas e giberelinas transformando-se em meristemas, culminando na formação do nódulo, o qual vai abrigar a bactéria (TAIZ et al., 2017).

No interior dos nódulos está presente o complexo enzima nitrogenase, que é formado por duas enzimas, a ferroproteína e a ferro-molibdênio proteína, que são responsáveis pela

fixação de N no nódulo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A Fe-proteína funciona como doadora de elétrons para a FeMo-proteína, num processo dependente de hidrólise de MgATP (BURK; BURRIS, 1941). O complexo enzimático da nitrogenase quebra a ligação tripla dos átomos do N₂ e esse é convertido por bactérias a formas assimiláveis pela planta, nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) (TAIZ et al., 2017).

No citoplasma das células nodulares infectadas também está presente a proteína leghemoglobina a qual se liga ao oxigênio, sendo capaz de armazenar O₂ suficiente para a manutenção da respiração celular por alguns segundos, além de fornecer ao nódulo coloração rosada no seu interior (EPSTEIN; BLOOM, 2005), indicando que esse está em plena atividade. No entanto, a efetividade do processo de FBN é complexo, pois durante o ciclo da cultura há constante formação e renovação dos nódulos no sistema radicular da planta, contribuindo para que o processo de formação até o estabelecimento da bactéria e realização da FBN seja bastante responsivo a diversos fatores do meio. Alguns fatores que interferem nessa efetividade são temperaturas altas (DEAK et al., 2019; INDRASUMUNAR; DART; MENZIES, 2011), acidez, baixa fertilidade e disponibilidade de água do solo (DEAK et al., 2019; STECCA et al., 2019) e compatibilidade entre tratamento de sementes e inoculantes (DA SILVA et al., 2018; SILVA et al. 2011).

2.2 CO-INOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA

Na cultura da soja a FBN é realizada predominantemente por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Contudo, outras associações vêm se destacando para melhorar a eficiência da utilização do N pela cultura, como é o caso da co-inoculação que consiste na utilização de microorganismos diferentes que produzem efeito sinérgico (BÁRBARO et al., 2009).

Neste contexto, destacam-se as bactérias do gênero *Azospirillum*, pois contribuem para o processo de FBN (FUKAMI et al. 2016), produzem hormônios promotores de crescimento como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (TIEN; GASKIN; HUBBELL, 1979), possuem capacidade de solubilizar fosfato e promovem indução de resistência sistêmica a estresses ambientais e doenças (HUNGRIA et al., 2013).

Os aumentos na produção dos compostos promotores de crescimentos podem auxiliar no desenvolvimento e produtividade das plantas (ARAUJO et al., 2012). Um dos principais benefícios da utilização dessas bactérias é o maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas, possibilitando explorar mais volume de solo e, portanto, promovendo vantagens em relação a demanda de nutrientes e água (DEAK et al. 2019; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Estudos vêm demonstrando resultados positivos envolvendo a co-inoculação de bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. Essa pode beneficiar a germinação das sementes, a ramificação radicular, o crescimento das plantas e a nodulação (JUGE et al., 2012). Segundo Groppa, Zawozinik e Tomaro (1998), a co-inoculação promove um aumento no número de nódulos na raiz principal da planta, além de aumentar em 23% o teor de N presente nas plantas quando comparadas a inoculação somente com *Bradyrhizobium*. Ferri et al. (2017) observaram aumento no rendimento de grãos variando de 10 a 20% em relação à inoculação padrão (*B. japonicum*).

2.3 COBALTO E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA

O crescimento e desenvolvimento ideal de plantas cultivadas são dependentes de 17 elementos essenciais (FAROOQ et al., 2012). Esses são denominados macronutrientes quando exigidos em maior quantidade e micronutrientes quando em menor quantidade. A deficiência ou disponibilidade inadequada de um desses elementos pode acarretar em redução do crescimento ou até mesmo morte das plantas (MENGEL et al., 2001).

Os micronutrientes formam complexos enzimáticos que ligam a enzima ao substrato e participam também de reações redox, pois sua presença em grupos protéicos permite que eles catalisem essas reações por meio da transferência de elétrons. Além disso, os micronutrientes estão envolvidos nos principais processos fisiológicos da fotossíntese e da respiração (MENGEL et al., 2001) e sua deficiência pode impedir esses processos fisiológicos vitais, limitando assim o ganho de produtividade das culturas.

Na cultura da soja estudos vem demonstrando a importância dos micronutrientes Co e Mo (BARBARO et al., 2009), sendo que a aplicação desses proporciona aumento na germinação de sementes (GUERRA et al., 2008). O Mo, em leguminosas, está envolvido na nutrição e assimilação de N pelas plantas, fazendo parte dos componentes de pelo menos cinco enzimas que catalisam reações muito diversas participando dos processos de transferência de elétrons (MALAVOLTA, 2006). O Mo faz parte da nitrato redutase, reduzindo o NO_3^- a NO_2^- possibilitando sua incorporação em compostos orgânicos nas raízes e na parte aérea da planta. Para exibir atividade biológica, o molibdato precisa estar ligado a pterina para ser convertido no cofator de Mo (Moco). O Moco passa a fazer parte do sítio ativo das enzimas molibdômicas, onde o Mo pode variar seu estado de oxidação entre Mo (IV), Mo (V) e Mo (VI), possibilitando a transferência de proteínas, elétrons e oxigênio de um substrato para outro (HILLE, 2013). Também faz parte da enzima nitrogenase na forma de

Fe-Mo proteína, quando essa recebe os elétrons da Fe-proteína ocorre sua ligação com o N_2 , e na presença destes elétrons, mais os H advindos do processo de respiração via metabolismo oxidativo, juntamente com ATPs ocorre a quebra da ligação tripla do N_2 atmosférico resultando em $NH_3 + H_2$. Esses dois processos, de redução e nitrogenase, permitem a transformação de N a formas assimiláveis pela planta (MARSCHNER, 1986; PRADO, 2008).

O Co é um elemento essencial para os microrganismos que realizam a FBN, pois faz parte da estrutura das vitaminas B_{12} , sendo importante na formação da coenzima cobalamida que é precursora da legmoglobina, que determina a atividade dos nódulos (LOPES; LEONEL JUNIOR, 2000).

Portanto, qualquer alteração na disponibilidade destes nutrientes para a planta pode resultar em interferências no processo de FBN (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010) e por consequência na produtividade de grãos da cultura. As quantidades requeridas de Co e Mo pelas plantas de soja são pequenas e sua aplicação via semente constitui-se uma das formas mais práticas de adubação. Contudo há trabalhos que demonstram que aplicação de micronutrientes no tratamento de sementes pode ocasionar efeitos tóxicos nas bactérias inoculadas, reduzindo sua sobrevivência (BÁRBARO et al., 2009; SILVA et al., 2011). Neste caso, a pulverização foliar pode ser mais eficiente por evitar o contato direto das bactérias com os micronutrientes, porém implicaria em aumento nos custos de produção para sua aplicação. Todavia, Dourado Neto et al. (2012) não encontraram diferenças na produtividade de grãos quando da aplicação de Co e Mo via semente ou via foliar. Outros trabalhos já indicam que o método mais eficaz para aplicação desses micronutrientes é no tratamento de sementes (GALINDO et al., 2017; JOHANSEN et al., 2006). Portanto, se faz necessário a realização de estudos de modo a identificar o melhor modo para aplicação desses nutrientes, assim como alternativas que visem à manutenção da sobrevivência de bactérias mesmo na aplicação de Co e Mo no tratamento de sementes.

2.4 OSMOPROTETORES

Os osmoprotetores são utilizados na forma de revestimento de sementes após o tratamento de sementes. Permitem a utilização conjunta de fungicidas, inseticidas e microorganismos benéficos (ARAÚJO et al., 2017). O revestimento consiste na deposição de uma camada fina e uniforme à superfície da semente não alterando sua forma, podendo ser utilizado juntamente com o tratamento químico e biológico sem afetar a germinação.

São constituídos por alguns compostos como polímeros que trazem melhorias na uniformidade de distribuição de fungicidas sobre a superfície das sementes, aumentando sua retenção (REICHENBACH, 2004), minimizando os riscos de fitotoxidez ocasionados pelo tratamento de sementes e possuem propriedades protetoras capazes de reduzir os efeitos das flutuações de umidade relativa (DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007), prolongando a sobrevivência dos rizóbios. Além disso, os micronutrientes, fungicidas e inseticidas podem ser aplicados diretamente às sementes em menor quantidade em comparação a aplicação foliar (SHINDE et al., 2015).

Os osmoprotetores aumentam a sobrevivência das bactérias durante o período que antecede a simbiose com as raízes das plantas por fornecem substratos que servem de componentes de nutrição às bactérias; disponibilizam substâncias que atuam na expressão gênica em prol da formação do nódulo, acelerando o processo de reconhecimento entre bactérias e raízes; aditivos celulares também estão presentes em sua composição, permitindo maior concentração de microrganismos vivos nas sementes durante o processo de inoculação; polímeros que reduzem os efeitos das flutuações na umidade relativa e melhoram a adesão do inoculante as sementes (ARAÚJO et al. 2017; WESSMAN et al. 2011; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007; STECCA et al. 2019).

Dentro desse contexto o uso de um produto inerte como o osmoprotetor, após o tratamento de sementes e anterior a inoculação e co-inoculação, poderia ser uma alternativa viável na manutenção da sobrevivência das bactérias.

3 ARTIGO 1 - OSMOPROTEÇÃO, COBALTO, MOLIBDÊNIO E CO-INOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA

Resumo

As sementes são agentes de introdução das tecnologias de proteção e nutrição de plantas, pois as inovações são aplicadas via tratamento de sementes (TS) pelo menor custo e facilidade de operações. Contudo, o processo de inoculação é primordial para fornecimento de nitrogênio (N) para a cultura da soja e envolve organismos vivos, os quais em contato com produtos utilizados no TS podem ter sua viabilidade reduzida. Objetivou-se com essa pesquisa avaliar a utilização de um osmoprotetor entre a co-inoculação e a aplicação de Cobalto (Co) e Molibdênio (Mo) via TS, além da definição do modo de aplicação do Co e Mo na cultura da soja. Foram conduzidos dois experimentos na safra 2017/2018 e dois na 2018/2019 com as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. O delineamento experimental foi de blocos aos acaso com quatro repetições, envolvendo um bifatorial (2 x 3) + 1 constituído por utilização ou não de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo nas sementes, foliar ou sem sua aplicação + testemunha. O uso de osmoprotetor juntamente ao tratamento químico de sementes (fungicida, inseticida, Co e Mo) reduziu a massa seca de nódulos, massa de mil grãos, número de legumes e produtividade de grãos da soja. O Co e Mo aplicados no TS, na ausência de osmoprotetor incrementou em média 12,6 % a produtividade de grãos (PG) em relação ao tratamento somente co-inoculado para a cultivar NS 5959 IPRO. A co-inoculação anual das sementes promoveu acréscimos de 11,8% e 2,4% na produtividade de grãos das cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, respectivamente. A co-inoculação aumenta o teor de proteína bruta nos grãos da cultura da soja. A utilização da co-inoculação associado ao Co e Mo ampliam a produtividade da cultura da soja.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, micronutrientes, polímeros, aditivo celular e teor de proteína.

OSMOPROTECTION, COBALT, MOLYBDENUM AND CO-INOCULATION IN SOYBEAN CULTURE

Summary

Seeds are generally considered the plant component through which innovation technologies for plant protection and nutrition are applied, via the seed treatment (ST) process, as this involves minimum expenditure and is simple to perform. The inoculation process is crucial for supplying the soybean crop with nitrogen (N) and includes living organisms, which may show reduced viability on coming into contact with the ST products. This research aimed at assessing the effectiveness of an osmoprotectant between the co-inoculation and application of Cobalt (Co) and Molybdenum (Mo) during ST, as well as to specify the best moment of applying the Co and Mo in soybean. In the 2017/2018 and 2018/2019 seasons two experiments were conducted at each period, using the NS 5959 and TMG 7062. A cultivars. The randomized complete block design was adopted with four replications, in factorial (2 x 3)+1 experiment, constituted by use or not of osmoprotectant and application of Co and Mo in the seeds, leaf or without its application + control. The use of osmoprotectant coupled to the chemical seed treatment decreased the dry weight of nodules, thousand grain weight, number of pods and yield of soybeans. The Co and Mo in ST, in the absence of osmoprotectant, increased on average 12.6% the grain yield (GY) compared to the treatment only co-inoculated for cultivar NS 5959. Annual seed co-inoculation promoted increases of 11.8% and 2.4% in grain yield of cultivars NS 5959 IPRO and TMG 7062, respectively. Co-inoculation increases the crude protein content in soybean grains.

Key words: Biological fixation of nitrogen, micronutrients, polymers, cell additive, protein content

Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) possui papel importante na economia mundial, pois somente em 2018 movimentou em torno de 31,7 bilhões de dólares (Mapa 2019). A cultura destaca-se por ser uma aleuro-oleaginosa com alto valor nutricional, sendo seus grãos constituídos por proteínas, vitaminas, minerais e fibras (Medic *et al.* 2014). A quantidade de proteína no grão representa aproximadamente 40% da sua composição, sendo importante na alimentação humana e animal. Além disso, por ser produzida em grande escala e pela alta produção de proteína por área, o custo de compra é inferior comparada a outras fontes como carne, leite e ovo. Esses fatores vêm contribuindo para expansão da sua área cultivada, contudo, com a estimativa de crescimento populacional de 9,55 bilhões de pessoas até 2050, a demanda mundial por alimento mais que duplicará, sendo necessário o aumento de produtividade nas áreas já cultivadas (FAO 2014).

Para aumentar a produtividade de grãos, a nutrição de plantas é um dos fatores principais representando 27,82% nos custos de produção da lavoura entre os anos-safra 2007/2008 e 2015/2016 (Conab 2016). Dentre os nutrientes necessários para o bom desempenho da cultura destaca-se o nitrogênio (N) pelo elevado teor de proteína presente nos grãos. A obtenção de N para a cultura ocorre por meio da simbiose entre planta e bactérias do gênero *Bradyrhizobium* realizando-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a qual pode disponibilizar até 84% do N total necessário a cultura, garantindo economicidade e menores danos ambientais pela não utilização de fertilizantes nitrogenados (Hungria *et al.* 2006). Além das bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, outro grupo de bactérias vêm se destacando em sua utilização juntamente com essas, são as pertencentes ao gênero *Azospirillum sp.* São bactérias associativas capazes de promover o crescimento das plantas pela produção de hormônios de crescimento (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), indução de resistência a doenças e estresses ambientais (FUKAMI *et al.* 2017), capacidade de solubilizar fosfato (TAHIR *et al.* 2013) e realizar FBN (FUAMI *et al.* 2016; HUNGRIA *et al.* 2013), consequentemente proporcionando acréscimos de produtividade à cultura (QUEIROZ REGO *et al.* 2018; FIPKE *et al.* 2016).

Entretanto, a FBN é prejudicada por alguns fatores como a deficiência de micronutrientes, dentre eles o Cobalto (Co) e Molibdênio (Mo). O Mo, em leguminosas, está envolvido na nutrição e assimilação de N pelas plantas, fazendo parte dos componentes de enzimas que catalisam reações e participando dos processos de transferência de elétrons (MENDEL, R. R.; SCHWARZ, 1999; HILLE, 2013). A transferência de elétrons do Mo ao nitrito ocorre para o NO_3^- ser reduzido a NO_2^- , que é a primeira etapa da incorporação do N

como NH_2 em proteínas. Também faz parte da enzima nitrogenase na forma de Fe-Mo proteína, que recebe os elétrons da Fe-proteína ocorrendo sua ligação com N_2 , e na presença destes elétrons mais os H advindos do processo de respiração via metabolismo oxidativo e juntamente com ATPs ocorre a quebra da ligação tripla do N_2 resultando em $\text{NH}_3 + \text{H}_2$. Esses dois processos, de redução e nitrogenase, permitem a transformação de N_2 a formas assimiláveis pela planta (HU; HIBBE, 2013; IGARASHI; SEEFELDT, 2003).

O Co é um elemento essencial aos microrganismos que vão realizar a FBN, pois faz parte da estrutura das vitaminas B12, sendo importante na formação da co-enzima cobalamida, que é precursora da legmoglobina, a qual determina a atividade dos nódulos (MUS, *et al.* 2013). Portanto, qualquer alteração na disponibilidade destes nutrientes pode resultar em interferências no processo de FBN e por consequência na produtividade de grãos da cultura. Porém, muitos agricultores deixam de realizá-la por desconhecem suas vantagens e/ou por incerteza da compatibilidade das bactérias presentes na inoculação com os nutrientes.

Aumentos na produtividade de grãos de soja pela utilização de Co e Mo associado à inoculação com *Bradyrhizobium* ou à co-inoculação (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) são verificados nas pesquisas de Dourado Neto *et al.* (2012) e Galindo *et al.* (2017). Todavia algumas também indicam que a aplicação desses nas sementes podem reduzir a sobrevivência de bactérias inoculadas devido ao pH, salinidade e ação bactericida de alguns produtos, reduzindo o número de células viáveis a nodular as raízes da planta (SILVA *et al.* 2011). Alternativas como a aplicação de Co e Mo por meio de pulverização têm sido utilizadas, de modo a evitar o contato direto com as bactérias inoculadas nas sementes mantendo sua sobrevivência (SANTANA *et al.* 2011). Todavia, devido às sementes serem preconizadas como veículo de tecnologias de proteção e nutrição de plantas pela facilidade e menor custo de operação, alternativas para manutenção e viabilidade destes processos no tratamento de sementes têm sido pesquisadas. Uma delas é a aplicação de osmoprotetores nas sementes. Esses possuem na constituição protetores celulares que ajudam na redução do efeito tóxico do tratamento de semente, polímeros que reduzem os efeitos das flutuações na umidade relativa e melhoram a adesão do inoculante as sementes, além disso, fornecem substratos que servem de componentes de nutrição às bactérias e substâncias sinalizadoras que beneficiam a comunicação entre as bactérias e as raízes da planta, portanto viabilizando uma maior sobrevivência dessas e, conseqüentemente, maior nodulação (ARAÚJO *et al.* 2017; WESSMAN *et al.* 2011; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007; STECCA *et al.* 2019).

Levando em consideração que as bactérias utilizadas na co-inoculação (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) não formam esporos, portanto, são mais suscetíveis a fatores deletérios que ocorrem durante o processo de inoculação e após no solo (BERNINGER *et al.* 2018; O'CALLAGHAN, 2016), e que sua utilização é indispensável para a cultura da soja, pois reduzem o custo de produção da lavoura e não causam danos ao meio ambiente, são necessários produtos e tecnologias que visem a sobrevivência das bactérias inoculadas, mantendo as células viáveis em ocupar em número suficiente a rizosfera. Para tanto, objetivou-se avaliar a aplicabilidade de um osmoprotetor entre a co-inoculação e a aplicação de Co e Mo via tratamento de semente, e o modo de aplicação do Co e Mo na cultura da soja.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos a campo nas safras 2017/2018 e 2018/2019, em área experimental do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais, localizada no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), latitude 29°43'2.81" S e longitude 53°43'58.28" O com uma altitude de 116 metros. A classificação da região, Rio Grande do Sul, é 86,7% Cfa e 13,3% Cfb segundo a classificação de Köppen (ALVAREZ *et al.* 2013), sendo as características principais a temperatura média do mês mais quente 24,8 °C e a temperatura média do mês mais frio de 14,1 °C (HELDWEIN; BURIOL; STRECK, 2009).

O solo da área foi classificado como Argissolo Vermelho distrófico arênico (EMBRAPA, 2013), Ultisol (USDA, 2014). A análise química do solo na camada de 0-10 cm apresentou como características: Laudo 2017 - solo com pH (água, 1:1) = 5,7; matéria orgânica (% m/v) = 2,0; argila (% m/v) = 21; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 35,9; potássio (cmol_c dm⁻³) = 0,153; H + Al (cmol_c dm⁻³) = 3,9; CTC (pH 7, cmol_c dm⁻³) = 11,8; saturação de bases (%) = 67,0. Laudo 2018 - solo com pH (água, 1:1) = 5,5; matéria orgânica (% m/v) = 2,2; argila (% m/v) = 26; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 11,8 potássio (cmol_c dm⁻³) = 0,164; H + Al (cmol_c dm⁻³) = 3,9; CTC (pH 7, cmol_c dm⁻³) = 12,2; saturação de bases (%) = 67,9.

A semeadura dos experimentos foi realizada no dia 30 de novembro de 2017 e 06 de novembro de 2018 sobre resteva de trigo. Foram utilizadas as cultivares de soja NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, com densidades de semeadura de 37 e 26 sementes m⁻² respectivamente em ambas as safras.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições por tratamento, envolvendo um modelo bifatorial (2 x 3) + 1 constituído pela utilização ou não de

osmoprotetor e aplicação de Co e Mo via TS, foliar em V3 ou sem sua aplicação, totalizando seis tratamentos e a testemunha sem tratamento. Os tratamentos foram: T1: somente tratamento de semente (Testemunha); T2: somente co-inoculado; T3: co-inoculado + Co e Mo no TS; T4: co-inoculado + Co e Mo em V3; T5: co-inoculado + osmoprotetor; T6: co-inoculado + Co e Mo e osmoprotetor no TS; T7: co-inoculado + osmoprotetor no TS e Co e Mo em V3. Cada unidade experimental foi constituída de 7,75 m de comprimento por 2,25 m de largura, com cinco fileiras espaçadas 0,45 m, totalizando 17,4 m² de área total e 6,75 m² de área útil.

A partir da análise química de solo foi realizada a adubação da área, onde os macronutrientes P₂O₅ e K₂O foram fornecidos no sulco com utilização da semeadora adubadora, para expectativa de cinco toneladas de produtividade de soja por hectare, juntamente com o processo de semeadura. Os manejos de pragas, doenças e plantas daninhas foram realizados conforme as recomendações técnicas e evitando que esses fatores interferissem no desenvolvimento da cultura (REUNIÃO... 2016).

No tratamento químico das sementes foi utilizado fungicida + inseticida: Piraclostrobina 25g i.a L⁻¹ + Tiofanato metílico 225g i.a L⁻¹ + Fipronil 250g i.a L⁻¹ (Standak[®] Top) na dose 2 mL kg⁻¹ de sementes. No recobrimento das sementes foi utilizado 20 mL ha⁻¹ de Mo e 2 mL ha⁻¹ de Co e quando aplicados via foliar em V3 foi utilizado o dobro das doses. Do osmoprotetor foram aplicados 1 mL kg⁻¹ de sementes (água, metabólicos ativos de bactérias, complexo de açúcares e biopolímeros). A co-inoculação foi realizada com inoculante líquido a base da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (concentração de 7 x 10⁹ UFC mL⁻¹ de bactérias fixadoras de N) na dose de 2 mL kg⁻¹ de sementes, e *Azospirillum brasilense* (concentração de 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias fixadoras de N) na dose de 2,0 mL kg⁻¹ de sementes.

Quando as plantas atingiram o estágio fenológico R2 (pleno florescimento, uma flor aberta num dos dois últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida), conforme a escala fenológica proposta por Fehr e Caviness (1977), foi realizada a contagem de nódulos das raízes. Para avaliação foram coletadas, aleatoriamente, quatro plantas de cada unidade experimental. As plantas foram coletadas mantendo-se um volume de solo pré-estabelecido para cada planta de 0,008 m³ com dimensões de 0,2 (L1) x 0,2 (L2) x 0,2 (H) coletadas com auxílio da pá-de-corte, centralizando duas plantas no quadro 0,2 (L1) x 0,2 (L2) m. O número de nódulos foi determinado pela contagem direta de nódulos na raiz principal e secundárias de cada planta (NNP, planta⁻¹). Após a contagem realizou-se a lavagem dos nódulos com posterior secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 48 horas. Após esse

período, as amostras foram retiradas da estufa e pesadas determinando-se a massa seca de nódulos por planta (MSN, mg planta⁻¹). As partes aéreas destas mesmas plantas foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 48 horas e pesadas para obtenção da massa seca de planta (MPA, g planta⁻¹).

No estádio R2 foi realizada a coleta de solo para o isolamento e identificação de *Azospirillum* por meio das técnicas descritas por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995) e de *Bradyrhizobium* por meio técnicas descritas por Hungria et al. (1994). Essas avaliações foram realizadas pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS).

Na maturação plena da cultura (R8) foram coletadas cinco plantas em sequência, na fileira de cultivo da área útil da unidade experimental, para a determinação do número de legumes por planta (NLP, planta⁻¹). Foram colhidas as plantas de cinco metros das três fileiras centrais da unidade experimental (6,75 m²), e após a colheita as amostras foram trilhadas e limpas para a aferição e correção da umidade dos grãos (base 13%) e obtenção da produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e massa de mil grãos (MMG, g). Após, amostras de sementes de cada tratamento foram enviadas a União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP) para avaliação do teor de proteína dos grãos por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). Os dados de proteínas foram avaliados segundo o delineamento inteiramente casualizado, pois os blocos não apresentaram significância, sendo as repetições de cada tratamento misturadas formando uma amostra única de grãos e para a avaliação foram realizadas três repetições de cada amostra.

Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F). As médias foram submetidas à procedimentos complementares de acordo com as respostas apresentadas pela interação e desdobrou-se em contrastes os graus de liberdade *versus* a testemunha pelo teste de Scheffé em nível de 5% probabilidades de erro e as interações significativas foram submetidas ao teste de comparação de médias de Scott–Knott em nível de 5% de probabilidade de erro no software estatísticos Genes®.

Resultados

Na tabela 1 e 2 estão apresentados os resumos das análises de variâncias das cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. Ambas não apresentaram diferença significativa entre o fatorial e sua respectiva testemunha para as variáveis NNP e MNP em ambos os anos de experimentos. Na cultivar NS 5959 a testemunha obteve MPA, NLP e PG inferiores a média do fatorial, sendo que na safra 2017/2018 a MMG e PB também se apresentaram

inferiores. Já na TMG 7062 o teor de PB foi maior no fatorial na safra 2018/2019. Na safra 2017/2018 a MPA da testemunha foi superior ao fatorial e 2018/2019 essa foi inferior juntamente com a MMG.

Para a cultivar NS 5959 verifica-se que o NLP e PG do fatorial foram, respectivamente 11,9% e 15,8% superiores em relação à testemunha na safra 2017/2019 e 25% e 7,8% na 2018/2019. Na TMG 7062 mesmo as médias não sendo significativas, a PG e PB também mostraram-se superiores, indicando vantagens da re-inoculação a cada safra (Tabela 1 e 2).

O fatorial (Osmoprotetor X Co e Mo) apresentou interações duplas significativas na cultivar NS 5959 para as variáveis NLP, PG e PB para a safra 2017/2018, e NLP e PG para 2018/2019. Para a TMG 7062 houve interação dupla na MPA em 2017/2018, MMG em 2018/2019 e PB para a safra 2018/2019 (Tabela 1 e 2).

A MPA na safra 2017/2018 para a cultivar TMG 7062 apresentou-se reduzida quando se aplicou o osmoprotetor em conjunto com Co e Mo no TS e onde não ocorreu a aplicação de Co e Mo. Observa-se também que mesmo não havendo redução na MNP da TMG 7062, no tratamento somente com osmoprotetor houve redução da MPA (Tabela 3). Já quando aplicado foliar, o Co e Mo, mesmo com a aplicação do osmoprotetor podem ter aumentado a eficiência de FBN das bactérias que formaram os nódulos dessas raízes (Tabela 2). Para a mesma variável MPA e mesma safra, na NS 5959, o efeito foi significativo para o fator Co e Mo destacando-se sua aplicação no TS (Tabela 4).

A variável NLP é um dos constituintes principais dos componentes de produtividade da cultura da soja. É possível observar novamente que a aplicação de Co e Mo juntamente com osmoprotetor prejudicou o desenvolvimento das plantas na cultivar NS 5959, porém quando da sua aplicação sem osmoprotetor no TS, a quantidade de NLP é superior aos demais tratamentos (Tabela 4 e 5). A MMG para a cultivar TMG 7062, na safra 2018/2019 também foi reduzida pela aplicação dos produtos em conjunto (Tabela 5).

Na PG observa-se diferença significativa para a cultivar NS 5959 no tratamento com aplicação de Co e Mo, implicando em maiores produtividades quando aplicado no TS sem osmoprotetor em ambas as safras, e em V3 com osmosprotetor para a safra 2017/2018 (Tabela 4 e 5). Na aplicação de Co e Mo em V3 pode-se observar que essa é capaz de proporcionar acréscimos na produtividade em relação a não aplicação desses nutrientes quando o osmoprotetor é aplicado. O teor de PB também foi reduzido quando foi utilizado Co, Mo e osmoprotetor juntos (Tabela 4 e 5).

Quanto ao custo monetário para condução do experimento, variou de R\$2784,09 a 2860,09 por hectare, onde foram utilizadas as tecnologias de co-inoculação (R\$13,00 ha⁻¹), osmoproteção (R\$3,00 ha⁻¹) e aplicação de Co e Mo (R\$30,00 ha⁻¹). Na aplicação de Co e Mo via foliar foi utilizada o dobro da dose do tratamento nas sementes, sendo somado ao custo total R\$ 30,00 e não acrescentado valor de operação maquinário/implementos, pois essa geralmente é realizada juntamente com a aplicação de herbicida pós-emergente (Tabela 6).

Pelas tecnologias Co-inoculação + Co e Mo no TS foi obtido em média ganho líquido em relação à testemunha de R\$ 929,00 ha⁻¹ para NS 5959 e R\$404,00 ha⁻¹ para TMG 7062, comprovando a eficiência desses e as vantagens pelo baixo custo e alto retorno financeiro. Os resultados também apontam a obtenção de lucro ao produtor quando Co e Mo são aplicados foliar, o que deixa o produtor com essa alternativa caso não possa realizá-la no tratamento de sementes. Contudo, as respostas para as duas cultivares foram distintas, sendo que para a TMG 7062 em alguns tratamentos houve redução do lucro ao produtor quando comparados a testemunha.

Discussão

No estudo a testemunha corresponde ao tratamento em que não foi realizado nenhum tipo de inoculação, somente utilizou-se fungicida e inseticida nas sementes. Contudo, no Brasil, a prática de inoculação é necessária, estando recomendada nas indicações técnicas para a cultura da soja, pois as bactérias *Bradyrhizobium* não são autóctones (REUNIÃO...2016; ALBERTON *et al.* 2006), e em áreas onde já ocorre o seu uso prolongado podem ser encontradas em populações baixas e com menor eficiência de FBN (ZERPA *et al.* 2013). O que explica a redução da PG para o tratamento testemunha. Segundo Hungria, Nogueira e Araújo (2013) a inoculação anual pode proporcionar acréscimos na produtividade de grãos em 8,4% e a co-inoculação 16,1%.

Quanto ao *Bradyrhizobium*, geralmente, as bactérias que sobrevivem no solo de inoculações anteriores já não possuem a mesma eficiência das inoculadas, e por serem mais adaptadas ao meio ambiente acabam sendo altamente competitivas (GRÖNEMEYER *et al.* 2014), sendo um desafio a rápida adaptação das bactérias inoculadas (OUMA *et al.* 2016). A perda de eficiência tem como causa à possibilidade de interação microbiana negativa ou incompatibilidade com outros simbiontes presentes no solo (NKOT *et al.* 2015). Um indício disso está na pesquisa de Ferreira *et al.* (2000), onde após 17 anos da inoculação somente 38% das bactérias isoladas do solo eram das cepas inoculadas.

Em relação às bactérias do gênero *Azospirillum* verifica-se uma população superior no fatorial, o que implica em alongamento e maior número de raízes laterais nas plantas, sendo maior o volume de solo explorado e, portanto, maior a capacidade de captação de água e nutrientes (COHEN *et al.* 2015; DEAK *et al.* 2019; PUENTE *et al.* 2018) influenciando no desenvolvimento e produtividade de grãos da cultura. Essas vantagens foram relevantes principalmente para a safra 2017/2018, pois durante o estágio de florescimento e enchimento de grãos da cultura ocorreram dias com precipitações abaixo da média (Figura 1), que segundo Mucava *et al.* (2015) e Ku *et al.* (2013) podem ocasionar a inibição da fotossíntese e redução da transpiração das plantas, devido ao fechamento estomático que reduz a proporção de CO₂/O₂ na folha. Em resposta a esse estresse hídrico, além de modificações na arquitetura de raízes, outros mecanismos podem ter sido desencadeados por essas bactérias como o ajuste osmótico por meio da produção de prolina (GARCÍA *et al.* 2017).

Quanto ao aumento de PB nos tratamentos co-inoculados (fatorial), também há relação com a introdução de bactérias novas na área a cada safra, as quais fornecem com maior eficiência N para formação de proteínas nos grãos. Esse aumento é importante principalmente para a indústria produtora de ração animal, além disso, o uso da proteína de soja tem baixo custo, o que tem impulsionado a indústria alimentícia pelo acréscimo da sua utilização.

Nos tratamentos onde o osmoprotetor e Co e Mo foram aplicados em conjunto no TS os resultados podem ser explicados pela incompatibilidade do TS e bactérias, que reduziu a MNP e consequentemente a FBN e, portanto menor foi o fornecimento de N para desenvolvimento e crescimento das plantas. A incompatibilidade ocorre pelo efeito tóxico dos produtos do tratamento de sementes (fungicida, inseticida, Co e Mo) que pelo uso do osmoprotetor acabam formando uma calda mais concentrada e com maior aderência as sementes, reduzindo a sobrevivência das bactérias. Todavia, a necessidade do tratamento químico de sementes é indispensável para assegurar um melhor estabelecimento das plantas sob condições desfavoráveis a germinação (BALARDIN *et al.* 2011). Contudo, pesquisas indicam essa incompatibilidade de tratamentos químicos com bactérias inoculadas, as quais causam redução no número de células viáveis a nodular as raízes da plantas (COSTA *et al.* 2013; SILVA *et al.* 2018) devido ao pH, salinidade e ação bactericida de alguns produtos (BÁRBARO *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2011).

Em relação à utilização de osmoprotetor, esse possui em sua constituição polímeros, que segundo Hartley, Gemell e Deaker (2012) alteram a secagem das sementes resultando na mortalidade de rizóbios inoculados. Para Deaker *et al.* (2007, 2011), a perda de água nos tratamentos com polímeros está relacionada com as diferentes propriedades de absorção de

umidade o que altera a taxa de reidratação e desidratação das células, além disso, há uma redução do fluxo de oxigênio para as bactérias tendo influência na sobrevivência dessas.

Observa-se também que mesmo não havendo redução na MNP da TMG 7062, no tratamento somente com osmoprotetor houve redução da MPA indicando menor eficiência das bactérias que nodularam essas raízes (Tabela 3). Esse fato pode estar relacionado com as bactérias autóctones terem maior capacidade de competição contra as inoculadas, e efetuarem a infecção das raízes (GRÖNEMEYER *et al.* 2014), pois o solo pertencente a esse tratamento apresentou a maior UFC para *Bradyrhizobium sp.* (Tabela 7). Portanto, é possível que essas bactérias estejam com um nível metabólico baixo e necessitem de outros fatores para realizar a FBN eficientemente. Além disso, quando a nodulação ocorre por bactérias autóctones, geralmente, é mais atrasada localizando-se um, dois centímetros da coroa da raiz resultando em plantas menos vigorosas (HUNGRIA; MENDES, 2015).

Quando aplicado foliar, o Co e Mo, mesmo com a aplicação do osmoprotetor podem ter aumentado a eficiência de FBN das bactérias que formaram os nódulos dessas raízes (Tabela 2), pois esses micronutrientes são fundamentais no processo de FBN, sendo que o Mo participa da enzima nitrogenase a qual é responsável pela quebra do N₂ em formas assimiláveis pelas plantas e o Co faz parte da síntese de legmoglobina, que determina a atividade dos nódulos (MUS, *et al.* 2013). Já para a mesma variável MPA e mesma safra, na cultivar NS 5959, o efeito do Co e Mo destacou-se na aplicação no TS. Isso pode ser explicado pelo método de aplicação garantir uma aplicação mais uniforme no campo e as quantidades fornecidas são adequadas para o crescimento da planta. Uma outra possibilidade é que o Co e Mo já aplicado no início do desenvolvimento da planta possa impulsionar a FBN com maior eficiência antecipadamente, pois segundo Welch e Shuman (1995) o Co aplicado via foliar demora mais a chegar às raízes da planta, pois é parcialmente móvel diferindo do aplicado via sementes que é móvel. Além disso, no momento da aplicação foliar a área apresentava palhada, a qual pode ter servido de anteparo retardando o contato com a planta.

As diferenças para as variáveis NLP e MMG podem ter tido como principal influência o nutriente N, ou seja, a capacidade das bactérias que infectaram as raízes das plantas de realizar FBN. Destaca-se que no estágio fenológico de florescimento pleno da cultura (R2) ocorre alto acúmulo de N pelas plantas nas folhas, passando a ser destinado primeiramente para a não abscisão das flores e depois de legumes. Já no início do enchimento de grãos têm-se outro acúmulo de N devido ao aumento da fotossíntese, pois ocorre intensa remobilização e translocação de fotoassimilados para as sementes (CÂMARA, 2014). Portanto, o enchimento

de grãos está diretamente relacionado com a atividade fotorespiratória e fotossintética da planta (KASCHUK *et al.* 2010; AINSWORTH *et al.* 2012).

Quanto a PG para a cultivar NS 5959 no tratamento com aplicação de Co e Mo, sem osmoprotetor a utilização desses micronutrientes é de fundamental importância na obtenção de maiores produtividades para a cultura, contudo, o osmoprotetor juntamente com esses nas sementes acabou prejudicando os NLP influenciando diretamente na produtividade de grãos, como já elucidado anteriormente. Já na aplicação de Co e Mo em V3 é importante observar que o osmoprotetor pode ter proporcionado as bactérias inoculadas maior tempo de sobrevivência e também maior capacidade de competição, pois na constituição dos osmoprotetores há substratos que servem para proteção para essas bactérias (ARAÚJO *et al.* 2017), substâncias sinalizadoras que beneficiam a comunicação entre as bactérias e as raízes da planta estão presentes e também substratos que servem de substrato nutritivo. A infecção das raízes pelas bactérias inoculadas, que são mais eficientes aliada à aplicação de Co e Mo também necessários no processo de FBN pode ter sido primordial na construção desta produtividade de grãos.

O teor de PB também foi reduzido quando foi utilizado Co, Mo e osmoprotetor juntos (Tabela 4 e 5). Essa redução pode estar relacionada também com o menor número de bactérias que infectaram essas plantas, pois a formação de proteínas é dependente da quantidade de N disponibilizado à planta. Ressalta-se que o valor pago pelo grão está relacionado ao teor PB presente no grão, contudo, o PB vem reduzindo ao longo das safras o que desestimula os países exportadores dos grãos. Um entrave em relação ao aumento no teor de PB nos grãos está na falta de estímulo ao produtor para investir em tecnologias que proporcionem acréscimos desse, sendo uma alternativa a transferência ao produtor de bonificações pelo aumento da qualidade do grão em relação ao PB.

Evidencia-se a re-inoculação a cada safra de soja, pois mesmo com a população alta de *Bradyrhizobium* existente no tratamento testemunha (Tabela 2), acréscimos de produtividade e teor de proteína nos grãos foram encontrados, sendo o processo importante para garantir a persistência de cepas de elite das bactérias, as quais possuem maior eficiência no processo de FBN (MENDES; HUNGRIA; VARGAS, 2004). Deve-se também levar em consideração as cultivares utilizadas devido à interação planta-bactéria, visto que, foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados. Observar a necessidade dos micronutrientes Co e Mo no desenvolvimento e crescimento das plantas, vista a melhorias nos componentes de produtividade da cultura e conseqüentemente maiores produtividades e teor de proteína nos grãos. Destaca-se também a necessidade de pesquisas quanto à compatibilidade de aditivos,

polímeros, osmoprotetores, entre outras substâncias e bactérias inoculadas utilizadas no tratamento de sementes.

Quanto ao investimento para utilização das tecnologias é notável a lucratividade do produtor, resultados que corroboram com os de Galindo et al. (2017). Contudo, as respostas para as duas cultivares foram distintas, sendo que para a TMG 7062 em alguns tratamentos houve redução do lucro ao produtor quando comparados a testemunha, corroborando com Xu et al. (2009) que também observaram respostas diferentes conforme o genótipo de soja utilizado. Portanto destaca-se a necessidade de mais estudos sobre a interação quanto às bactérias e cultivares.

Conclusão

O osmoprotetor aliado ao tratamento químico de sementes (fungicida, inseticida, Co e Mo) é prejudicial aos componentes de produtividade avaliados no estudo e conseqüentemente na redução de produtividade de grãos da soja.

O Co e Mo utilizado no tratamento de sementes, na ausência de osmoprotetor, incrementa em 22% o número de legumes nas plantas e 12,6% a produtividade de grãos da cultura da soja em relação a utilização somente de co-inoculação para a cultivar NS 5959 IPRO.

A co-inoculação anual das sementes de soja promove acréscimo médio de 11,8% e 2,4% na produtividade de grãos das cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA respectivamente.

A co-inoculação anual aumenta o teor de proteína bruta nos grãos da cultura da soja.

A co-inoculação associada a aplicação de Co e Mo é uma tecnologia que contribui para o aumento na produtividade de grãos da cultura da soja sem danos ambientais e com custo de produção relativamente baixo.

Conflito de interesses

‘Os autores declaram não haver conflitos de interesse.’

Padrões Éticos

‘Não se aplica’

Referências

- Ainsworth EA, Yendrek CR, Skoneczka JA and Long SP** (2012) Accelerating yield potential in soybean: potential targets for biotechnological improvement. *Plant, cell & environment* **35**, 38-52.
- Alberton O, Kaschuk G and Hungria M** (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 1298–1307.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes G, Leonardo J and Sparovek G** (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* **22**, 711-728.
- Araujo RS, Cruz SPD, Souchie EL, Martin TN, Nakatani AS, Nogueira MA and Hungria M** (2017) Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: Technological innovation for large-scale agriculture. *International journal of microbiology* **2017**, 1-11.
- Balardin RS, da Silva FDL, Debona D, Dalla Corte G, Dalla Favera D and Tormen NR** (2011) Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como redutores dos efeitos do estresse hídrico em plantas de soja. *Ciência Rural* **41**, 1120-1126.
- Bárbaro IM, da Cruz Centurion MAP, Gavioli EA, Sarti DGP, Júnior LSB, Ticelli M and Miguel FB** (2009) Análise de cultivares de soja em resposta à inoculação e aplicação de cobalto e molibdênio. *Revista Ceres* **56**, 342-349.
- Berninger T, López ÓG, Bejarano A, Preininger C and Sessitsch A** (2018) Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microbial Biotechnology* **11**, 277-301.
- Câmara GMS** (2014) Fixação biológica de nitrogênio em soja. *Informações Agronômicas* **147**, 1- 9.

- Cassán F, Vanderleyden J and Spaepen S** (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**, 440-459.
- Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli FJ, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia CN and Piccoli PN** (2015) *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia plantarum* **153**, 79-90.
- CONAB** (2016) *Compêndio de Estudos Conab/ Companhia Nacional de Abastecimento*, **1**. Brasília, Brasil: CONAB. Available at <http://www.conab.gov.br> (Accessed 23 August 2019).
- Costa MR, Cavalheiro JCT, Goulart ACP and Mercante FM** (2013) Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. *Summa Phytopathologica* **39**, 186-192.
- Deak EA, Martin TN, Fipke GM, Stecca JDL, Tabaldi LA, Nunes UR, Wink JEM and Grandó LFT** (2019) Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop. *Australian Journal of Crop Science* **13**, 1327-1334.
- Deaker R, Hartley E and Gemell G** (2012) Conditions affecting shelf-life of inoculated legume seed. *Agriculture* **2**, 38-51.
- Deaker R, Roughley RJ and Kennedy IR** (2007). Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 573-580.
- Döbereiner J, Baldani VLD and Baldani JI** (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília, Brasil: Embrapa-SPI.
- Dourado Neto D, Dario GJA, Martin TN, Silva MRD, Pavinato OS and Habitzreiter TL** (2012) Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. *Semina: Ciências Agrárias* **33**, 2741-2752.

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** (2013) *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*, Third edition. Brasília, Brasil: EMBRAPA.
- FAO** (2014) *FAOSTAT: Inputs: Population: Annual Time Series: Population Estimation and Projection*. Rome, Italy: FAO. Available at <http://faostat.fao.org/site/550/DesktopDefault.aspx?PageID=550> (Accessed 20 May 2019).
- Fehr VR and Caviness CE** (1977) *Stages of Soybean Development*. Ames: Iowa State University.
- Ferreira MC, Andrade DDS, Chueire LMDO, Takemura SM and Hungria M** (2000) Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 627-637.
- Fipke GM, Conceição GM, Grando LFT, Ludwig RL, Nunes UR and Martin TN** (2016) Co-inoculation with diazotrophic bacteria in soybeans associated to urea topdressing. *Ciência e Agrotecnologia* **40**, 522-533.
- Fukami J, Ollero, FJ, Megías M and Hungria M** (2017) 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* **7**, 153.
- Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS and Hungria M** (2016) Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* **6**, 3.
- Galindo FS, Teixeira Filho M, Buzetti S, Santini, JM, Ludkiewicz MG and Baggio G** (2017) Modes of application of cobalt, molybdenum and *Azospirillum brasilense* on soybean yield and profitability. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **21**, 180-185.
- García JE, Maroniche G, Creus C, Suárez-Rodríguez R, Ramirez-Trujillo JA and Groppa MD** (2017) In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different

Azospirillum native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological research* **202**, 21-29.

Grönemeyer JL, Kulkarni A, Berkelmann D, Hurek T and Reinhold-Hurek B (2014)

Rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa: diversity, adaptations, and host specificity. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 7244-7257.

Hartley EJ, Gemell LG and Deaker R (2013) Some factors that contribute to poor survival

of rhizobia on preinoculated legume seed. *Crop and Pasture Science* **63**, 858-865.

Heldwein AB, Buriol AG and Streck NA (2009) O clima de Santa Maria. *Ciência &*

Ambiente **38**, 43-58.

Hille R (2013) The molybdenum oxotransferases and related enzymes. *Dalton Transactions*

42, 3029-3042.

Hu, Y and Ruibbe MW (2013) Nitrogenase assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*

(*BBA*)-*Bioenergetics* **1827**, 1112-1122.

Hungria M and Mendes IC (2015) Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis?

In De Bruijn FJ (eds). *Biological Nitrogen Fixation*, pp. 1009-1023. New Jersey, New York: John Wiley & Sons, Inc.

Hungria M, Nogueira MA and Araujo RS (2013) Co-inoculation of soybeans and common

beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils* **49**, 791-801.

Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Crispino CC, Moraes JZ, Sibaldelli RN, Mendes

IC and Arihara J (2006) Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science* **86**, 927-939.

- Hungria, M and Araújo SR** (1994) *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola*. Brasília, Brasil: EMBRAPA- SPI.
- Igarashi RY and Seefeldt LC** (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 351-384.
- Kaschuk G, Hungria M, Leffelaar PA, Giller KE and Kuyper TW** (2010) Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. *Plant Biology* **12**, 60-69.
- Ku YS, Au-Yeung WK, Yung YL, Li MW, Wen CQ, Liu X and Lam HM** (2013) Drought stress and tolerance in soybean. In: Board JE (ed). *A comprehensive survey of international soybean research-genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships*, pp. 209-237. InTechOpen.
- MAPA** (2019) *AGROSTAT: Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro*. Available at <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. (Accessed 20 July 2019).
- Medic J, Atkinson C and HurburghCR** (2014). Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American oil chemists' society* **91**, 363-384.
- Mendes IC, Hungria M and Vargas MAT** (2004) Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils* **40**, 28-35.
- Mendel RR and Schwarz G** (1992) Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**, 33-69., 1999.
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GED, Poole PS, Udvardi MK, Voigt CA, Ané JM, Peters JW** (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to non legumes. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 3698-3710.

- Mutava RN, Prince SJK, Syed NH, Song L, Valliyodan B, Chen W and Nguyen HT** (2015) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **86**, 109-120.
- Nkot LN, Fankem H, Adamou S, Ngakou A, Nwaga, D and Etoa FX** (2015) Abundance of legume nodulating bacteria in soils of diverse land use systems in Cameroon. *Universal Journal of Plant Science* **3**, 97-108.
- O'Callaghan M** (2016) Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 5729-5746.
- Ouma EW, Asango AM, Maingi J and Njeru EM** (2016) Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. *International Journal of Agronomy* **2016**, 1-7.
- Puente ML, Gualpa JL, Lopez GA, Molina RM, Carletti SM and Cassán FD** (2018) The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. *Symbiosis* **76**, 41-49.
- Queiroz Rego CH, Cardoso FB, Cândido ACS, Teodoro PE and Alves CZ** (2018) Co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* increases yield and quality of soybean seeds. *Agronomy Journal* **110**, 2302-2309.
- Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, 41** (2016) *Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, safras 2016/2017 e 2017/2018*. Passo Fundo, Brasil: UPF.
- Santana MJ, de Sousa FCA, da Silveira AL and Silva CA** (2011) Aplicação de cobalto, molibdênio e inoculante na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill). *Global Science and Technology* **4**, 1-8.

- Silva K, da Silva EE, Farias EDNC, Chaves JS, Albuquerque CNB and Cardoso C** (2018) Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* pre-inoculation in association with chemical treatment of soybean seeds. *African Journal of Agricultural Research* **13**, 726-732.
- Silva AF, Schoninger EL, Monteiro S, Caione G, de Carvalho MAC, Dalchiavon FC and Noetzold R** (2011) Inoculação com *Bradyrhizobium* e formas de aplicação de cobalto e molibdênio na cultura da soja. *Agrarian* **4**, 98-104.
- Stecca JDL, Martin TN, Lúcio ADC, Deak EA, Fipke GM and Bruning LA** (2019) Inoculation of soybean seeds coated with osmoprotector in diferents soil pH's. *Acta Scientiarum. Agronomy* **41**.
- Tahir M, Mirza MS, Zaheer A, Dimitrov MR, Smidt H and Hameed S** (2013). Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science* **7**, 1284-1292.
- USDA** (2014) *Keys to Soil Taxononmy*. Washington: USDA.
- Welch RM and Shuman L** (1995) Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **14**, 49-82.
- Wessman P, Mahlin D, Akhtar S, Rubino S, Leifer K, Kessler V and Hakansson S** (2011) Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 2518-2528.
- Xu Y, Wang G, Jin J, Liu J, Zhang Q and Liu X** (2009). Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 919-925.

Zerpa M, Mayz J and Mendez J (2013) Effects of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants on soyben (*Glycine max* (L.) Merr.) growth and nodulation. *Annals of Biological Research* **4**, 193–199.

Tabela1 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA para safra 2017/2018, representada pelos quadrados médios das variáveis número de nódulos (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e teor de proteína bruta nos grãos de soja (PB).

FV	GL	NNP	MNP	MPA	MMG	NLP	PG	PB
NS 5959 IPRO								
Blocos	3	155,75	600,14	0,69	15,59	12,24	7523,96	- ¹
Tratamentos	6	349,24	3429,03*	2,75*	85,16	64,23*	451321,30*	1,28*
Fatorial	5	394,4	4113,47*	2,28*	17,13	46,97*	232361,73*	0,69*
Contraste	1	123,43	6,88	5,11*	425,32*	150,48*	1546119,16*	4,22*
Erro	18	409,78	917,89	0,78	34,08	12,43	7588	0,01
Média Testemunha		109,75	220	9,17	180,53	50,08	3580,38	31,35
CoMo (D)	2	412,13	892,54	3,81*	31,58	46,63	254527,34	1,25
Osmoprotetor (C)	1	16,67	4160,67	0,96	1,84	26,04	10973,07	0,05
DxC	2	565,54	7310,79*	1,41	10,32	57,79*	320890,45*	0,45*
Média		115,75	218,58	10,39	191,67	56,87	4251,92	32,64
CV (%)		17,49	13,9	8,53	3,04	6,19	2,05	0,34
TMG 7062 INTACTA								
Blocos	3	141,75	1316	0,22	170,43	1,24	76645,58	- ¹
Tratamentos	6	541,61*	5619,20*	19,69*	146,63	60,98*	242193,00*	0,84*
Fatorial	5	649,90*	6203,84*	14,58*	167,74	70,18*	283330,70*	0,92*
Contraste	1	0,21	2696	45,24*	41,09	15,02	36504,49	0,43
Erro	18	180,44	1140,47	0,54	73,4	16,25	20791,04	0,23
Média Testemunha		93,25	272,75	15,42	209,85	55,67	3385,08	31,6
CoMo (D)	2	916,13	8177,54	2,32	6,64	39,31	134224,7	0,82
Osmoprotetor (C)	1	560,67	12,04	33,18	12,11	0,05	162006,4	0,07
DxC	2	428,29	7326,04*	17,59*	406,66*	136,12*	493098,80*	1,44*
Média		93	244,71	11,78	213,31	57,76	3488,3	32,01
CV (%)		14,44	13,8	6,25	4,01	6,98	4,13	1,52

*significativo pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Coeficiente de variação (CV%). ¹PB foi avaliado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, o GL do erro foi 14.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA para safra 2018/2019, representada pelos quadrados médios das variáveis número de nódulos (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e teor de proteína bruta nos grãos de soja (PB).

FV	GL	NNP ¹	MNP	MPA	NLP	MMG	PG	PB
NS 5959 IPRO								
Blocos	3	615,76	3805,67	22,52	30,33	14,23	190422,61	- ¹
Tratamentos	6	2772,70*	8475,18	81,64*	785,32*	42,39*	198776,90*	0,18
Fatorial	5	3325,85*	9917,54	69,19*	477,21*	49,45*	175103,97*	0,16
Contraste	1	6,96	1263,36	143,93*	2325,89*	7,08	317141,55*	0,27
Erro	18	496,75	3707,87	14,29	95,22*	10,28	54645,31	0,14
Média Testemunha		85,8	384,42	27,52	76,23	169,57	3572,17	31,96
CoMo (D)	2	1072,14	1254,76	55,41	576,3	0,79	59813,56	0,11
Osmoprotetor (C)	1	13066,66	40319,4	190,97	186,48	196,65	359097,27	0,37
DxC	2	709,15	3379,39	22,07	523,48*	24,52	198397,73*	0,12
Média		84,37	403,62	34	102,27	171,01	3876,31	32,29
CV (%)		26,41	15,08	11,11	9,54	1,87	6,03	1,16
TMG 7062 INTACTA								
Blocos	3	126,95	3465,71	10,14	71,75	20,53	20053,76	- ¹
Tratamentos	6	911,39*	6456,16	9,84	155,07*	82,43*	180275,84*	0,33*
Fatorial	5	1093,04*	7238,06*	0,98	186,07*	69,27*	213225,21*	0,37*
Contraste	1	3,14	2546,62	54,12*	0,05	148,22*	15528,99	0,12*
Erro	18	317,09	2477,35	7,32	53,38	18,11	40231,76	0,01
Média Testemunha		83	358	24,41	72	187,95	3479,8	32,05
CoMo (D)	2	676,79	3990,09	0,18	114	57,35	3115,27	0,39
Osmoprotetor (C)	1	1426,04	16752,92	0,92	260,04	100,04	485254,65	0,04
DxC	2	1342,79*	5728,61	1,81	221,16*	65,81*	287320,44*	0,53*
Média		83,7	330,74	28,38	71,87	194,53	3547,1	32,27
CV (%)		21,27	15,05	9,53	10,16	2,18	5,65	0,38

*significativo pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Coeficiente de variação (CV%). ¹PB foi avaliado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, o GL do erro foi 14.

Tabela 3 - Massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MPA, g planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) em função do em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar TMG 7062 INTACTA, safra 2017/2018.

	Interação (Osmoprotetor X Co e Mo)					
	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo
	MNP		MPA		MMG	
Sem CoMo	267 Aa*	295 Aa	13.7 Aa	10.9 Bb	212 Aa	217 Aa
CoMo TS	257 Aa	186 Bb	13.8 Aa	8.7 Bc	220 Aa	205 Bb
CoMo V3	212 Aa	251 Aa	11.4 Aa	12.2 Aa	206 Ba	220 Aa

*Médias não seguidas da mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta⁻¹), número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), proteína bruta no grão (PB, %) e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹) em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar NS 5959 IPRO, safra 2017/2018.

	Interação (Osmoprotetor X Co e Mo)								Fator principal
	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	
	MNP		NLP		PG		PB		
Sem CoMo	252 Aa*	178 Ba	53 Ab	56 Aa	3997 Bc	4178 Ab	32.98 Ba	33.24 Aa	10 b
CoMo TS	254 Aa	207 Ba	64 Aa	56 Ba	4694 Aa	4189 Bb	32.96 Aa	32.22 Bb	11 a
CoMo V3	190 Ab	231 Aa	57 Ab	56 Aa	4129 Bb	4325 Aa	32.13 Ab	32.27 Ab	10 b

*Médias não seguidas da mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Número de legumes (NLP, planta⁻¹), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) para a cultivar NS 5959 IPRO, e massa de mil grãos (MMG, g) e proteína bruta no grão (PB, %) para a TMG 7062 INTACTA em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo, safra 2018/2019.

Interação (Osmoprotetor X Co e Mo)								
	NS 5959 IPRO				TMG 7062 INTACTA			
	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo	Sem Osmo	Com Osmo
	NLP		PG		MMG		PB	
Sem CoMo	89 Ac	98 Aa	3830 Ab	3833 Aa	194.44 Aa	195.57 Aa	32.60 Aa	32.12 Ba
CoMo TS	122 Aa	99 Ba	4275 Aa	3676 Ba	196.76 Aa	186.53 Bb	32.67 Aa	32.27 Ba
CoMo V3	104 Ab	101 Aa	3890 Ab	3752 Aa	198.51 Aa	195.36 Aa	31.69 Bb	32.28 Aa

*Médias não seguidas da mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Custo total de produção, produtividade de grãos (PG, sacos ha⁻¹), receita bruta (RB, R\$ ha⁻¹), receita líquida (RL, R\$ ha⁻¹) e ganho líquido em relação à testemunha (GL, R\$ ha⁻¹) da cultura da soja em função dos tratamentos.

Tratamentos	Safrá 2017/2018				Safrá 2018/2019			
	NS 5959		TMG 7062		NS 5959		TMG 7062	
	PG*	RB	PG	RB	PG	RB	PG	RB
Testemunha	60	4200	56	3920	60	4200	58	4060
Co-inoculação	67	4690	56	3920	64	4480	62	4340
Co-inoculação+CoMo TS	78	5460	64	4480	71	4970	64	4480
Co-inoculação+CoMo V3	69	4830	58	4060	65	4550	58	4060
Osmo+Co-inoculação	70	4900	56	3920	64	4480	56	3920
Osmo+Co-inoculação + CoMo TS	70	4900	53	3710	61	4270	53	3710
Osmo +Co-inoculação + CoMo V3	72	5040	62	4340	63	4410	60	4200
Custo total de Produção CoMo TS			2830.09				2830.09	
Custo total de Produção CoMo V3			2860.09				2860.09	
	RL	GL	RL	GL	RL	GL	RL	GL
Testemunha	1416	-	1136	-	1416	-	1276	-
Co-inoculação	1893	477	1123	-13	1683	267	1543	267
Co-inoculação+CoMo TS	2633	1217	1653	517	2143	727	1653	377
Co-inoculação+CoMo V3	1973	557	1203	67	1690	274	1203	-73
Osmo+Co-inoculação	2102	686	1120	-16	1680	264	1120	-156
Osmo+Co-inoculação + CoMo TS	2070	654	880	-256	1440	24	880	-396
Osmo +Co-inoculação + CoMo V3	2180	764	1480	344	1550	134	1340	64

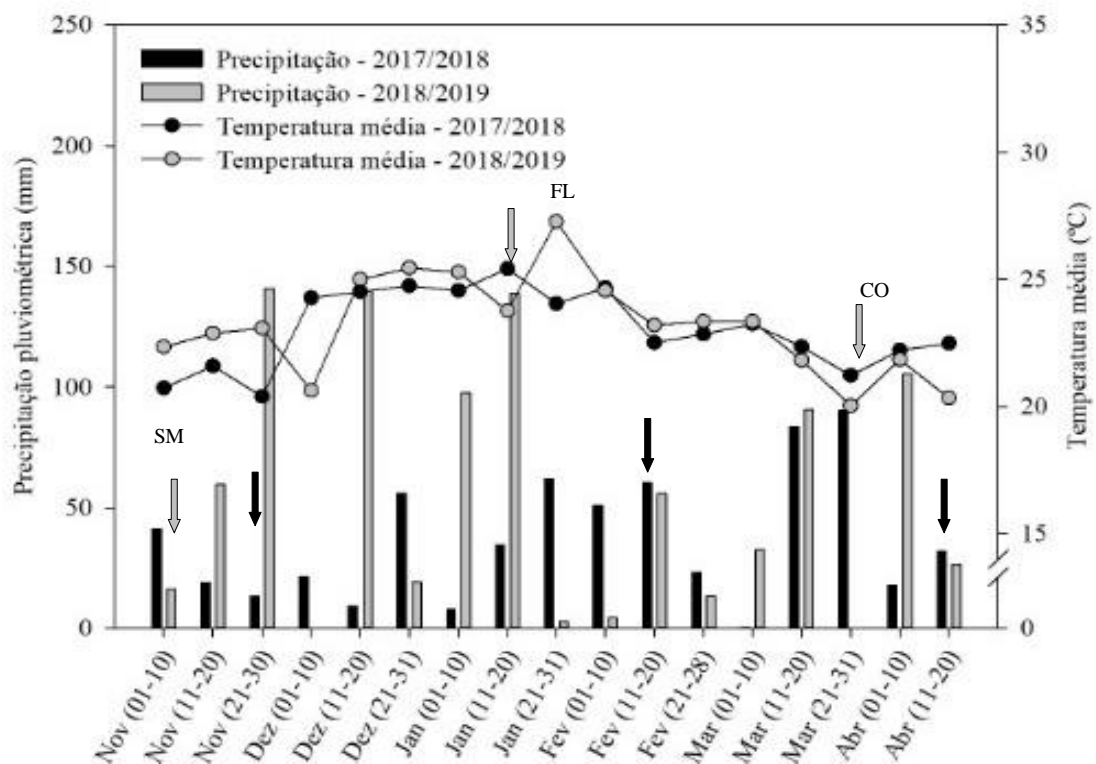
*Preço por saca de soja R\$70,00.

Tabela 7 - Populações de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* e *Azospirillum sp.* por grama de solo (UFC g⁻¹ solo) na área de condução do experimento em 2018 e 2019.

Tratamento	NS 5959 IPRO				TMG 7062 INTACTA			
	<i>Bradyrhizobium</i>		<i>Azospirillum</i>		<i>Bradyrhizobium</i>		<i>Azospirillum</i>	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
Testemunha	3.2x10 ⁶	2.6x10 ⁶	9.5x10 ²	1.5x10 ⁵	3.4x10 ⁶	7.0x10 ⁵	4.0x10 ³	1.1x10 ⁶
Co-ino*	3.4x10 ⁶	1.1x10 ⁶	2.5x10 ⁴	1.2x10 ⁵	3.2x10 ⁶	2.0x10 ⁵	2.5x10 ⁴	3.0x10 ⁴
Co-ino + CoMo TS	3.8x10 ⁶	2.5x10 ⁶	9.5x10 ³	3.0x10 ⁵	3.0x10 ⁶	1.2x10 ⁶	2.0x10 ³	1.5x10 ⁵
Co-ino + CoMo V3	3.1x10 ⁶	1.5x10 ⁶	9.5x10 ²	1.5x10 ⁵	3.4x10 ⁶	1.8x10 ⁶	2.0x10 ⁴	2.0x10 ⁵
Osmo + Co-ino	2.6x10 ⁶	2.9x10 ⁶	9.5x10 ²	2.0x10 ⁵	3.6x10 ⁶	1.2x10 ⁶	9.5x10 ³	4.0x10 ⁴
Osmo + Co-ino + CoMo TS	3.5x10 ⁶	7.7x10 ⁶	2.0x10 ³	3.0x10 ⁵	3.1x10 ⁶	7.5x10 ⁵	3.0x10 ³	1.1x10 ⁶
Osmo + Co-ino + CoMo V3	2.7x10 ⁶	1.8x10 ⁶	2.5x10 ³	2.0x10 ⁵	2.9x10 ⁶	1.1x10 ⁶	4.5x10 ³	3.0x10 ⁵

*Osmo abreviação para osmoprotetor. Co-ino abreviação para co-inoculação.

Figura 1 - Distribuição das precipitações pluviométricas (mm) e temperaturas médias (°C) em decêndios, dos meses de novembro e dezembro de 2017 e janeiro, fevereiro, março e abril de 2018 para o município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Semeadura: safra 2017/2018 em 28/11/2017 e safra 2018/2019 em 06/11/2018 (SM), florescimento: safra 2017/2018 em 15/02/2018 e safra 2018/2019 em 16/01/2019 (FL) e colheita: safra 2017/2018 em 12/04/2018 e safra 2018/2019 em 25/03/2018 (CO).



4 ARTIGO 2 – CO-INOCULAÇÃO, COBALTO E MOLIBDÊNIO BENEFICIAM A QUALIDADE DE SEMENTES DE SOJA

RESUMO

A qualidade fisiológica de sementes é fundamental para obtenção de um estande de plântulas uniforme e com maior capacidade de mitigar adversidades no estabelecimento do estande de plantas. Para isso, a planta genitora deve possuir condições nutricionais adequadas. Objetivou-se avaliar o modo de aplicação do cobalto (Co) e molibdênio (Mo), juntamente com a co-inoculação e o osmoprotetor, e seus efeitos sobre as alterações enzimáticas da planta genitora e a qualidade de sementes de soja da próxima geração. Nos experimentos foram utilizadas sementes e folhas das cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA providas de experimento de campo, as quais haviam sido submetidas a utilização ou não de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo nas sementes, foliar (V3) ou sem sua aplicação + testemunha (sementes com fungicida e inseticida), constituindo um bifatorial (2 x 3 +1). Nas sementes foram avaliadas a germinação, primeira contagem, massa seca de plântula, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica, e nas folhas a atividade da enzima guaiacol peroxidase, pigmentos fotossintéticos e conteúdo de proteínas. A co-inoculação anual mantém a qualidade fisiológica de sementes. O Co e Mo aplicados no tratamento de sementes, na ausência de osmoprotetor assegura a qualidade fisiológica de sementes co-inoculadas. A co-inoculação promove o aumento do teor de proteína nas folhas. Assim, a aplicação de Co e Mo via tratamento de sementes na co-inoculação deve ser realizada para melhorar o desempenho de plantas e obtenção de sementes de qualidade.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, bactérias promotoras do crescimento de plantas, micronutrientes, polímeros, aditivo celular.

CO-INOCULATION, COBALT AND MOLYBDENUM BENEFIT THE QUALITY OF SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT

The physiological quality of seeds is fundamental for obtaining a uniform seedling stand and with a greater capacity to mitigate adversities in the establishment of the plant stand. For this, the parent plant must have adequate nutritional conditions. The objective was to evaluate the method of application of cobalt (Co) and molybdenum (Mo), together with co-inoculation and osmoprotector, and their effects on the enzymatic changes of the parent plant and the quality of next generation soybean seeds. In the experiments, seeds and leaves of cultivars NS 5959 IPRO and TMG 7062 INTACTA were used, coming from a field experiment, which had been submitted to the use or not of osmoprotector and application of Co and Mo in the seeds, leaf (V3) or without its application + control (seeds with fungicide and insecticide), constituting a bifactorial (2 x 3 +1). The seeds were evaluated germination, first count, seedling dry mass, accelerated aging and electrical conductivity; and the activity of guaiacol peroxidase, photosynthetic pigments and protein content in leaves. Annual co-inoculation maintains the physiological quality of seeds. The Co and Mo applied in the seed treatment, in the absence of osmoprotector, ensure the physiological quality of co-inoculated seeds. Co-inoculation promotes increased protein content in the leaves. Thus, the application of Co and Mo via seed treatment in co-inoculation must be carried out to improve the performance of plants and obtain quality seeds.

Keywords: Biological nitrogen fixation, plant growth-promoting bacteria, micronutrients, polymers, cell additive.

INTRODUÇÃO

O aumento diário da necessidade de proteína e óleo no mundo, e a limitação de áreas agricultáveis requer alternativas como o aumento da produtividade na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). A utilização de sementes de qualidade é uma necessidade, pois visa o estabelecimento adequado de plantas na lavoura, que é o primeiro componente de produtividade da cultura a ser definido (KAHLON; BOARD; KANG, 2011).

A qualidade das sementes está relacionada às condições que a planta genitora foi exposta, como umidade e temperatura (WIJEWARDANA; REDDY; BELLALLOUI, 2019), disponibilidade de nutrientes (GAO; MA, 2015; KRUEGER et al., 2013; SINGH et al., 2014), e diferentes capacidades das cultivares para absorver, translocar e acumular nutrientes (WHITE; BROADLEY, 2009).

Esses fatores podem acarretar estresse oxidativo nas plantas, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GILL; TUTEJA, 2010) pelo desequilíbrio entre produção e eliminação dessas (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). As principais EROs acumuladas são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}) (GILL; TUTEJA, 2010) que nas células podem reagir com moléculas biológicas causando danos irreversíveis que levam a morte celular (BARBOSA et al., 2014).

Portanto, todos esses fatores contribuem na formação do embrião da semente, assim como da sua quantidade de reservas (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014), atuando principalmente no acúmulo de carboidratos, proteínas, lipídeos e constituição das membranas (TEIXEIRA et al., 2005), podendo originar sementes mal formadas e com diferentes composições.

A semente de soja é formada pelo embrião que representa 90% da sua massa, sendo composto pelo eixo embrionário e dois cotilédones (WOLF, 1972). Os cotilédones são reservas nutricionais de proteínas e fonte de energia metabólica, que ajudam a construir os tecidos vegetais necessários à germinação e estabelecimento das plântulas (GOYAGA et al., 2011; HAN et al., 2013; KIN et al., 2011). As principais proteínas são Glicinina e a β -conglucina que são fontes de N aminado para a semente em germinação (HAN et al., 2013; THANH; SHIBASAKI, 1978).

A formação de proteínas é dependente da disponibilidade de nitrogênio (N) para a planta. Na soja a quantidade é alta, pois seus grãos possuem 38% de proteínas (FERREIRA et al., 2016). Nessa cultura, o N é obtido principalmente pela simbiose entre as raízes da planta e bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, garantindo 84% do N total que a planta precisa pela fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Além do *Bradyrhizobium*, outras bactérias que se destacam são as *Azospirillum*, as quais são utilizadas em conjunto com *Bradyrhizobium*, no procedimento denominado co-inoculação (FIPKE et al., 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2015). São bactérias associativas que realizam FBN (FUKAMI et al., 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013), produzem fitohormônios (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), solubilizam fósforo (TAHIR et al., 2013) e induzem a resistência a doenças e a estresses

ambientais (FUKAMI et al., 2017). Portanto, a co-inoculação pode estar relacionada com a obtenção de sementes de maior qualidade pela disponibilidade de nutrientes que fornecem a planta, e produção de fitohormônios pela *Azospirillum*, que induzem o crescimento de raízes permitindo exploração de maior volume de solo, e conseqüentemente maior acesso a nutrientes e água (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Contudo, a deficiência de alguns nutrientes pode prejudicar a FBN, dentre eles o molibdênio (Mo) e o cobalto (Co). O Mo é constituinte da nitrato redutase, reduzindo o NO_3^- a NO_2^- possibilitando sua incorporação em compostos orgânicos nas raízes e na parte aérea da planta (HILLE, 2013). Também faz parte da enzima nitrogenase (presente em ambas as bactérias) na forma de Fe-Mo proteína, que juntamente com ATP realiza a quebra do N_2 a formas assimiláveis pela planta (HU; HIBBE, 2013). Já o Co faz parte da estrutura da vitamina B12, importante na formação da coenzima cobalamida que é precursora da legmoglobina, e determina a atividade dos nódulos (MUS et al., 2013). Portanto, com a aplicação de Co e Mo, a assimilação de N é mais eficiente, melhorando a formação de proteínas e enzimas, e conseqüentemente as reações bioquímicas na planta.

Todavia, a aplicação de Co e Mo no tratamento de sementes onde se realiza co-inoculação, pode afetar a sobrevivência das bactérias pelas formulações salinas, pH, ação bactericida e concentração (ALBINO; CAMPO, 2001; LI et al., 2017; SHAHID et al., 2019; SILVA et al., 2011; WU et al., 2018). Outros métodos/vias de aplicação do inoculante, Co e Mo tem sido utilizadas como via sulco de semeadura, pulverização foliar e no solo e sementes enriquecidas evitando o contato direto dos tratamentos com as bactérias inoculadas (CAMPO; ARAÚJO; HUNGRIA, 2009; GALINDO et al., 2017; FUKAMI et al., 2016). Porém, a aplicação nas sementes é preconizada como veículo de tecnologias de proteção e nutrição de plantas pelos produtores pela facilidade e menor custo de operação. Além disso, as quantidades necessárias dos nutrientes são pequenas e a aplicação via semente é mais prática e eficaz de adubação.

Alternativamente tem-se a aplicação de osmoprotetores que são aplicados após o tratamento de sementes (inseticida + fungicida + Co + Mo) e anterior a inoculação. São constituídos de substratos nutritivos que servem para as bactérias até a realização da associação/simbiose com as raízes das plantas; substâncias sinalizadoras que favorecem o reconhecimento entre bactéria-planta; polímeros que melhoram a adesão do inoculante as sementes e amenizam afeitos das flutuações de umidade; e protetores celulares que ajudam na redução do efeito tóxico do tratamento de sementes, permitindo, portanto, maior sobrevivência das bactérias inoculadas e conseqüentemente maior aporte de nutrientes à

planta (ARAÚJO et al., 2017; DEAKER; HARTLEY; GEMELL, 2012; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007).

A necessidade da utilização de tecnologias que garantam a disponibilidade de N, em quantidades adequadas ao desenvolvimento e crescimento das plantas de soja, se justifica para a obtenção de sementes de melhor qualidade fisiológica para a próxima geração. Ou seja, a capacidade da cultura de acumular reservas de N nas sementes (ZIMMER et al., 2016) com intuito de rápido e uniforme estabelecimento das novas plântulas a campo, pois segundo Conceição et al. (2018) ao longo de dez dias após semeadura a maior parte do N nos órgãos da nova plântula é derivada das reservas das sementes, sendo fundamental a reserva de N para sustentar o período heterotrófico da vida da plântula (ZHOU et al., 2019).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o modo de aplicação do Co e Mo, juntamente com a co-inoculação e o osmoprotetor, e seus efeitos sobre as alterações enzimáticas da planta genitora e a qualidade de sementes de soja da próxima geração.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), para avaliação da qualidade fisiológica das sementes e análises fisiológicas (enzimáticas) de folhas provenientes dos experimentos de campo conduzidos na safra 2017/2018, em área experimental do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais, UFSM.

Os experimentos de campo localizavam-se na latitude 29°43'2.81" S e longitude 53°43'58.28" O, com uma altitude de 116 metros. O clima local é classificado do tipo Cfa segundo Köppen (ALVAREZ et al., 2013), com temperatura média do mês mais quente 24,8 °C e do mês mais frio de 14,1 °C (HELDWEIN; BURIOL; STRECK, 2009). O solo foi classificado como Argissolo Vermelho distrófico arênico (EMBRAPA, 2013), Ultisol (USDA, 2006), apresentando na análise química do solo (camada de 0-10 cm): pH (água, 1:1) = 5,7; matéria orgânica (% m/v) = 2,0; argila (% m/v) = 21; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 35,9; potássio (cmol_c dm⁻³) = 0,153; H + Al (cmol_c dm⁻³) = 3,9; CTC (pH 7, cmol_c dm⁻³) = 11,8; saturação de bases (%) = 67,0. A cultura foi semeada sobre resteva de trigo.

Foram utilizadas as cultivares de soja NS 5959 IPRO (tipo de crescimento semi-determinado e grupo de maturação 5.9, NIDERA SEMENTES LTDA, Registro nº 29472) e TMG 7062 INTACTA (tipo de crescimento indeterminado e grupo de maturação 6.2, TMG TROPICAL MELHORAMENTO E GENÉTICA S/A, Registro nº 31288), sendo um

experimento com cada cultivar. O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro repetições por tratamento, sendo distribuídos segundo o modelo bifatorial (2 x 3) + 1 constituído pela utilização ou não de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo via tratamento de sementes (TS), foliar em V3 ou sem sua aplicação, totalizando seis tratamentos e a testemunha (sementes tratadas com fungicida e inseticida). Os tratamentos testados foram: T1: somente tratamento de semente (Testemunha); T2: somente co-inoculado; T3: co-inoculado + Co e Mo no TS; T4: co-inoculado + Co e Mo em V3; T5: co-inoculado + osmoprotetor; T6: co-inoculado + Co e Mo e osmoprotetor no TS; T7: co-inoculado + osmoprotetor no TS e Co e Mo em V3.

No tratamento químico das sementes foi utilizado fungicida + inseticida: Piraclostrobina 25g i.a L⁻¹ + Tiofanato metílico 225g i.a L⁻¹ + Fipronil 250g i.a L⁻¹ (Standak[®] Top) na dose 2 mL kg⁻¹ de sementes. No recobrimento das sementes foi utilizado 20 mL ha⁻¹ de Mo e 2 mL ha⁻¹ de Co e quando aplicados via foliar em V3 foi utilizado o dobro dessas doses. Aplicou-se o osmoprotetor (água, metabólicos ativos de bactérias, complexo de açúcares e biopolímeros) na dose de 1 mL kg⁻¹ de sementes. A co-inoculação foi realizada com inoculante líquido, a base da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (concentração de 7 x 10⁹ UFC mL⁻¹ de bactérias fixadoras de N) na dose de 2 mL kg⁻¹ de sementes e *Azospirillum brasilense* (concentração de 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias fixadoras de N) na dose de 2,0 mL kg⁻¹ de sementes.

A colheita das sementes foi realizada quando as plantas atingiram o estágio fenológico R8 (maturação plena), conforme a escala fenológica proposta por Fehr e Caviness (1977) e armazenadas em câmara fria a 15°C e umidade relativa de 55% por um período de seis meses até a realização dos testes no laboratório de sementes. As quatro repetições por tratamento do experimento de campo foram agrupadas, formando uma amostra única. O agrupamento foi permitido devido os blocos não apresentarem significância para as avaliações de campo, demonstrando que esses eram homogêneos. Sendo assim, no momento das avaliações das sementes cada amostra deu origem à quatro repetições, sendo o experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado. As características dos lotes de sementes estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das sementes: Umidade (U, %), massa de mil grãos (MMG, g), teor de proteína bruta (PB, %) e óleo (ÓLEO, %) das sementes provenientes dos tratamentos de campo em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA.

TRATAMENTOS	NS 5959				TMG 7062			
	U ¹	MMG	PB	ÓLEO	U	MMG	PB	ÓLEO
Testemunha	9.67	181	31.35	20.42	11.22	209	31.44	19.30
Co-inoculação	9.47	190	32.98	19.64	11.32	212	32.26	18.76
Co-inoculação+CoMo TS	9.57	195	32.96	20.33	10.65	220	31.63	19.32
Co-inoculação+CoMo V3	9.50	190	32.13	20.20	10.95	206	32.02	19.32
Osmoprotetor+Co-inoculação	9.50	191	33.24	19.76	10.92	217	31.09	19.47
Osmoprotetor+Co-inoculação+CoMo TS	9.70	192	32.22	20.76	11.22	205	31.62	18.68
Osmoprotetor +Co-inoculação+CoMo V3	9.47	190	32.27	20.18	11.30	220	32.81	19.11

¹ Umidade realizada anteriormente ao armazenamento. Os valores de MMG, PB e ÓLEO estão corrigidos para a umidade de 13%.

Para as análises enzimáticas foram coletadas folhas do terceiro e quarto trifólio da parte superior da planta em direção ao solo, no estágio fenológico R2, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C. Após, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e mantidas congeladas em ultra-freezer-80°C até o momento das análises.

AVALIAÇÕES NO LABORATÓRIO DIDÁTICO E DE PESQUISAS EM SEMENTES

Germinação de sementes (GE): Foram realizadas quatro repetições de 50 sementes, as quais foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira, e então organizadas em rolo. O papel foi umedecido com água destilada na quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram colocados em sacos transparentes e posteriormente acondicionados em câmara de germinação do tipo Demanda Bioquímica do Oxigênio (BOD), regulados para temperatura de 25 °C, com fotoperíodo constante. A contagem foi realizada no quinto e oitavo dia após a semeadura, e expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Primeira contagem ou vigor de sementes (VG): Realizada em conjunto com o teste de germinação, sendo avaliadas as plântulas normais no quinto dia após a semeadura.

Comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA): Foram semeadas 20 sementes em papel germitest submetidas as mesmas condições do teste de germinação de sementes. Aos

cinco dias em BOD foram aferidas de 10 plântulas normais de cada repetição usando-se uma régua graduada (cm) (NAKAGAWA, 1999).

Massa seca de planta (MS): As mesmas plântulas utilizadas para aferição do comprimento de plântulas foram colocadas em sacos de papel e levadas à estufa com circulação de ar forçada, mantida à temperatura constante de 65°C por um período de 48 horas para obtenção da massa seca de planta (NAKAGAWA, 1999).

Envelhecimento acelerado (EA): Foram distribuídas sementes de soja sobre uma tela de alumínio fixada no interior de caixas plásticas tipo gerbox, com 40 ml de água destilada. As caixas foram colocadas em estufa com circulação de ar a temperatura de 41° C por 48 horas. Após, foi realizado o teste de primeira contagem (quinto dia) (MARCOS FILHO; NOVENBRE; CHAMMA, 2001).

Condutividade elétrica (CE): Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes, com sua massa conhecida. As sementes foram colocadas em recipientes plásticos contendo 75 ml de água destilada, por um período de 24 horas sob luz constante e temperatura de 25°C. Após, realizou-se a leitura de condutividade elétrica da solução de embebição em condutivímetro calibrado (LOEFFLER; TEKRONY; EGLI, 1988).

AVALIAÇÕES NO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD): As amostras (0,5 g) foram homogeneizadas em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M (ZHU et al., 2004). Após, o homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da enzima segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H₂O₂ (3 mM). Após homogeneização foram adicionados 50 µL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida pela oxidação do guaiacol a tetraguaiacol pelo aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína). Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹cm⁻¹.

Conteúdo de proteínas: o conteúdo de proteínas foi determinado segundo Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides): foram extraídos das folhas pelo método de Hiscox e Israelstan (1979) e estimados usando a equação de Lichtenthaler (1987). 0,05g de folhas frescas foram incubadas a 65°C com dimetilsulfóxido (DMSO) até a retirada

completa dos seus pigmentos. As absorvâncias da solução foram medidas em espectrofotômetro (Celm E-205D) a 663 e 645 (para clorofilas totais) e 470 nm (para carotenóides).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F). As médias foram submetidas à procedimentos complementares de acordo com as respostas apresentadas pela interação e desdobrou-se em contrastes os graus de liberdade *versus* a testemunha e as interações significativas foram submetidas ao teste de comparação de médias de Scott–Knott e teste de Scheffé em nível de 5% de probabilidade de erro no software estatístico Genes®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição final das sementes é dependente da genética (características inerentes de cada cultivar) e das condições/fatores a qual a planta-mãe foi exposta (MARCOS FILHO, 2013; RINCKER et al., 2014). Nessa pesquisa observou-se que houve diferença significativa entre o fatorial (tratamentos co-inoculados) e sua testemunha (não co-inoculada) para as variáveis CPA, CR, EA, CE, VG e GE, sendo essas superiores em 13,8%, 15,2%, 23,4%, 20,6%, 22,2%, 9,8% respectivamente para a cultivar NS 5959. Para a TMG 7062 o VG teve acréscimo de 7% em relação a sua testemunha e redução de 8% no EA (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, representada pelos quadrados médios das variáveis explicativas comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), massa seca de plântula (MS, mg), envelhecimento acelerado (EA, %), condutividade elétrica (CE, $M^{-1} cm^{-1} g^{-1}$), vigor (VG, %) e germinação (GE, %)

NS 5959 IPRO								
FV	GL	CPA	CR	MS	EA	CE	VG	GE
Tratamentos	6	0.66*	6.47*	532.22*	231.23*	158.75*	227.32*	59.98*
Fatorial	5	0.61*	7.10*	635.57*	42.8	113.25*	45.44	10.64
Contraste	1	0.95*	3.29*	15.48	1173.43*	386.23*	1136.72*	306.72*
Erro	21	0.16	0.21	194.02	21.19	8.50	21.45	10.03
Média Testemunha		3.23	5.44	199.75	60.50	51.27	63.00	83.00
CoMo (D)	2	0.29	8.33	101.37	2.26	15.94	42.04	14.04
Osmoprotetor (C)	1	0.49	0.01	1457.04	2.20	2.36	18.37	9.37
DxC	2	0.97*	9.42*	759.04*	1.15	266.01*	62.37	7.87
Média		3.75	6.42	197.63	79.00	40.66	81.00	92.00
CV (%)		10.63	7.21	7.05	5.83	7.17	5.72	3.44
TMG 7062 INTACTA								
Tratamentos	6	0.57*	7.59*	1415.28*	127.81*	33.33*	164.81*	72.48*
Fatorial	5	0.69*	8.88*	1685.46*	114.80*	39.32*	172.74*	86.84*
Contraste	1	0.001	1.18	64.38	192.85*	3.39	125.14*	0.72
Erro	21	0.06	0.33	299.86	23.04	4.83	12.91	11.6
Média Testemunha		3.16	5.62	205.75	86.00	43.18	76.00	90.00
CoMo (D)	2	0.58	7.17	1909.54	91.5	21.91	276.79	44.79
Osmoprotetor (C)	1	1.90	3.21	2688.16	24.00	0.45	40.04	187.04
DxC	2	0.19	13.43*	960.04	183.50*	76.16*	135.04*	78.79*
Média		3.18	6.20	210.08	78.50	42.18	82.00	91.00
CV (%)		8.25	9.28	8.24	6.12	5.21	4.38	3.74

*significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Coeficiente de variação (CV%).

Os resultados estão relacionados à co-inoculação, pois permite melhor nutrição da planta genitora durante todo seu crescimento e desenvolvimento, e em decorrência maior a translocação de reservas para a semente. A interação entre bactéria (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) e raiz traz vantagens quanto ao aporte de nutrientes para as plantas, como de N proveniente da atividade das duas bactérias (FUKAMI et al., 2016), fósforo pela solubilização de fosfato e outros pela capacidade de *Azospirillum* de produzir fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes das plantas, aumentando o volume de solo explorado e, conseqüentemente, melhorando a absorção de nutrientes e água pelas plantas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014), beneficiando o conteúdo das sementes.

A solubilização de fosfato é fundamental para as plantas, pois o nutriente participa de processos metabólicos como a fotossíntese, síntese de ácidos nucleicos e glicose, respiração, ativação e desativação de enzimas, síntese e estabilidade de membranas celulares (fosfolipídios), FBN e na transferência de energia na forma de ATP (VANCE; UHDE-STONE; ALLEN, 2003). Em pesquisa realizada por Hungria et al. (2010), com *Azospirillum* na cultura do milho, maiores teores de P nas sementes foram encontrados. A presença de P nas sementes ocorre 75% na forma de ácido fítico, ficando disponível na fase inicial da germinação das sementes (RABOY, 2009). Marin et al. (2015) em pesquisa com a aplicação de adubação fosfatada em soja também observaram maior vigor das sementes, além de maiores concentrações de fósforo, ferro e zinco.

O maior acúmulo de reservas permite maior disponibilidade de N para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos e em consequência disso ocorrem alterações no crescimento e desenvolvimento de raízes e parte aérea da plântula (MARSCHNER, 2012; NARASIMHAN et al., 2013), como verificado para os comprimentos de raízes (CR) e parte aérea (CPA) que foram maiores (Tabela 2), o que proporciona vantagens quanto ao estabelecimento rápido e uniforme das plântulas, devido ao maior VG em ambas as cultivares, e CPA e CR na NS 5959 que conferem características que indicam as plântulas serem mais vigorosas (MARCOS FILHO et al., 1987; NAKAGAWA, 1999). Esses resultados também foram confirmados pelo maior valor de condutividade elétrica (CE) das sementes não co-inoculadas (Tabela 2). As sementes que não receberam co-inoculação apresentaram maior liberação de lixiviados por consequência da estruturação e seletividade das membranas (VIEIRA et al., 2002). A baixa disponibilidade de proteínas e enzimas que realizam a reorganização e formação das estruturas das membranas celulares pode não ter sido suficiente para que essa retornasse a configuração estável durante a embebição.

Quanto à absorção de N para as plantas, essa pode ser realizada pelas duas bactérias presentes nos tratamentos (*Bradyrhizobium e Azospirillum*) e vai influenciar diretamente na concentração de proteínas e óleo presentes na semente de soja (WILSON et al., 2014) (Tabela 1). Portanto, a disponibilidade de N foi dependente da FBN, que por sua vez depende da infecção das raízes pelas bactérias fixadoras de N (HU; HIBBE, 2013). Esse fato pode ter ocorrido mesmo com a testemunha, pois a área onde foi realizado o experimento já possuía histórico de cultivo com a cultura da soja e utilização da co-inoculação, indicando a presença dessas bactérias no solo (Tabela 3).

Tabela 3 - Populações de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* e *Azospirillum sp.* por grama de solo (UFC g⁻¹ solo) na área de condução do experimento em 2018.

TRATAMENTO	NS 5959 IPRO		TMG 7062	
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>
Testemunha	3.2x10 ⁶	9.5x10 ²	3.4x10 ⁶	4.0x10 ³
Co-inoculação	3.4x10 ⁶	2.5x10 ⁴	3.2x10 ⁶	2.5x10 ⁴
Co-inoculação+CoMo TS	3.8x10 ⁶	9.5x10 ³	3.0x10 ⁶	2.0x10 ³
Co-inoculação+CoMo V3	3.1x10 ⁶	9.5x10 ²	3.4x10 ⁶	2.0x10 ⁴
Osmoprotetor +Co-inoculação	2.6x10 ⁶	9.5x10 ²	3.6x10 ⁶	9.5x10 ³
Osmoprotetor+Co-inoculação+CoMo TS	3.5x10 ⁶	2.0x10 ³	3.1x10 ⁶	3.0x10 ³
Osmoprotetor+Co-inoculação+CoMo V3	2.7x10 ⁶	2.5x10 ³	2.9x10 ⁶	4.5x10 ³

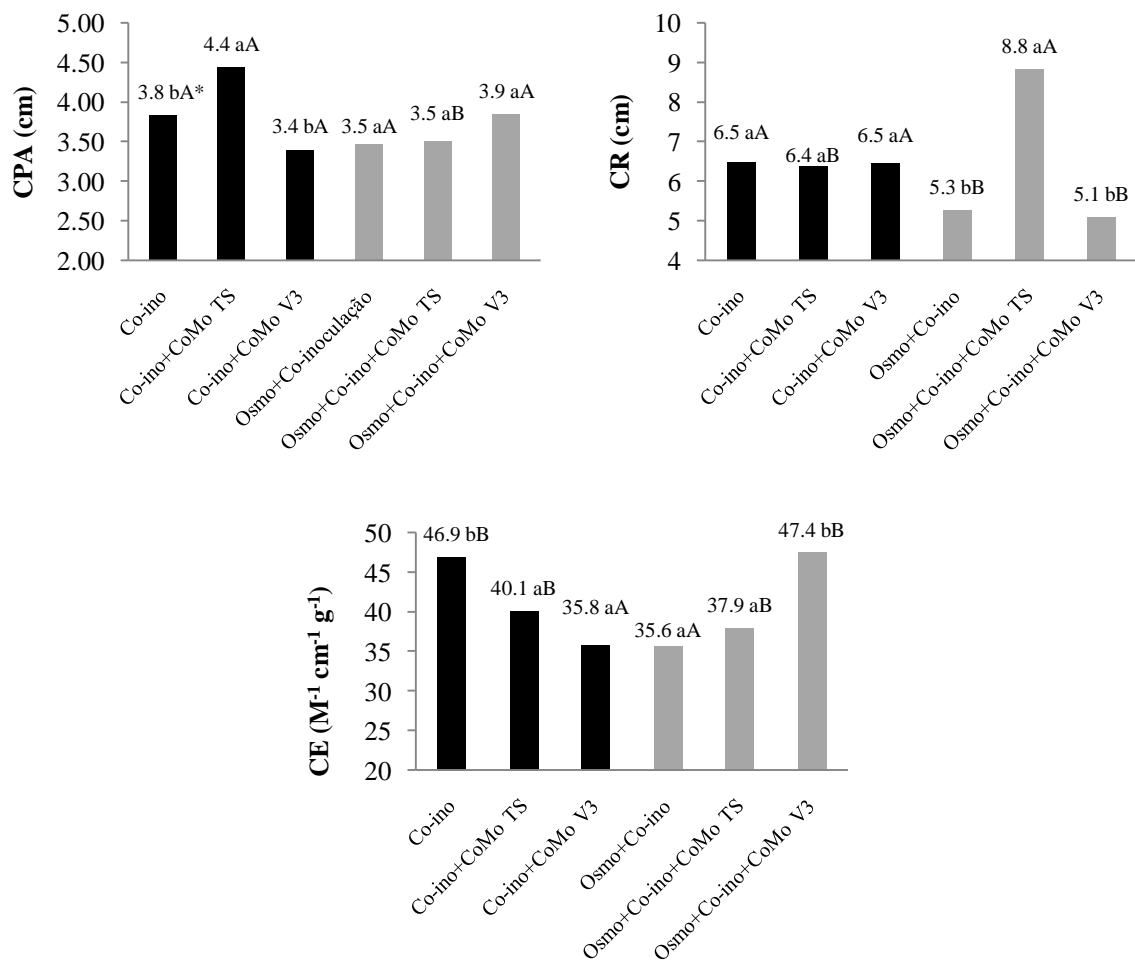
Todavia, quando se realiza a inoculação anual das bactérias, a eficiência em FBN é maior do que as autóctones no solo, pois não passam por condições estressantes que podem acarretar em mutações, diminuição da população e pela possibilidade de interação microbiana negativa ou incompatibilidade com outros simbiontes presentes no solo (GRÖNEMEYER et al., 2014; NKOT et al., 2015). Portanto, destaca-se a importância da realização da re-inoculação anual para a cultivar NS 5959, pois onde o processo foi realizado as sementes apresentaram maior vigor e germinação das sementes (Tabela 2).

Os tratamentos co-inoculados apresentaram características que indicam uma maior qualidade das sementes, podendo-se inferir que quanto maior a eficiência de FBN melhor sejam as reações bioquímicas que ocorrem na planta, devido à quantidade de proteínas e enzimas disponíveis nas sementes. Portanto, a formação e manutenção das membranas plasmáticas foram influenciadas positivamente durante o período de armazenamento e germinação das sementes.

Quanto ao fatorial (tratamentos co-inoculados) que apresentou significância (Tabela 2), na variável CPA para a cultivar NS 5959 foi maior nas plântulas que haviam recebido a aplicação de Co e Mo no tratamento de sementes e sem adição do osmoprotetor. Já para a CE houve sua redução pela aplicação de Co e Mo em relação a semente com co-inoculação. Portanto obtendo-se maior qualidade dessas sementes pela aplicação desses micronutrientes (Tabela 4, Figura 1). Esses resultados colaboram com os encontrados por Golo et al. (2009) quando Co e Mo foram aplicados em sementes inoculadas de soja. O Mo e Co estão diretamente ligados a FBN e conseqüentemente melhoram a assimilação e translocação de reservas para as sementes, principalmente de proteínas (TAIZ et al., 2017). Em pesquisa realizada por Campo, Araújo e Hungria (2009) com aplicação foliar de molibdato de sódio 20

dias após o florescimento, em plantas inoculadas com *Bradyrhizobium*, demonstraram que é possível aumentar as quantidades de N nos grãos de plantas, sugerindo assim uma estratégia adequada para atender requisitos de Mo dessas sementes para a próxima safra. Na mesma pesquisa, quando as sementes ricas em Mo foram inoculadas, as plantas que originaram-se dessas foram capazes de sustentar altas taxas de FBN, o que resultou em maior teor de proteínas nas sementes. Quanto ao Co em pesquisa realizada por Jayakumar et al. (2008), aumento na formação de nódulos radiculares e nos conteúdos de leghemoglobina foram observados em plantas de soja, inferindo-se conseqüentemente aumento da FBN. Portanto, Mo e Co são fundamentais para que planta se desenvolva e possa gerar sementes com alto vigor e qualidade.

Figura 1 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), massa seca de plântula (MS, mg) e condutividade elétrica (CE, $M^{-1} cm^{-1} g^{-1}$) pela aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo na cultivar NS 5959 IPRO.

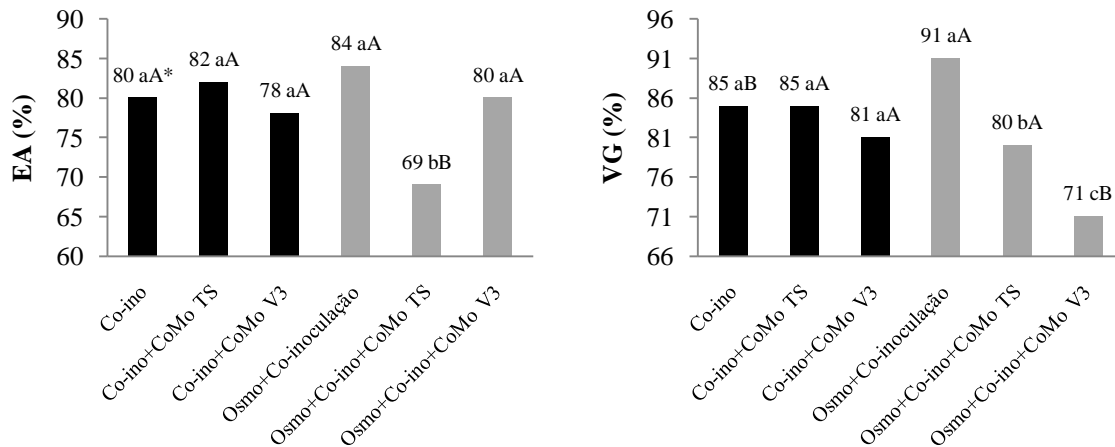


*Médias não seguidas da mesma letra, maiúsculas barra preta x cinza e minúsculas dentro das barras de mesma coloração, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à aplicação do osmoprotetor juntamente com Co e Mo no TS, observa-se um menor CPA na cultivar NS 5959 indicando menor qualidade das sementes (Tabela 4, Figura 1). Essa redução pode ter ocorrido pela disponibilidade de nutrientes nessas sementes devido ao menor número e eficiência das bactérias presentes nas plantas. A incompatibilidade dos produtos utilizados no tratamento de sementes (fungicida, inseticida, Co e Mo) e bactérias inoculadas é comumente relatada, pois esses podem ser tóxicos por apresentarem concentração salina e pH não compatíveis a sobrevivência dessas (SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2011; THILAKARATHNA; RAIZADA, 2017). Além disso, quando aplicados juntamente com o osmoprotetor acabam formando uma calda mais concentrada e com maior aderência nas sementes e por ser o osmoprotetor um substrato para as bactérias (ARAÚJO et al., 2017), acabam afetando a sobrevivência dessas com maior facilidade. Ainda, segundo Hartley, Gemell e Deaker (2012) os polímeros, que são constituintes dos osmoprotetores também podem alterar a taxa de secagem das sementes pelas diferentes propriedades de absorção de umidade, a qual modifica a taxa de desidratação e reidratação das células, além de ocorrer redução da transmissão de O₂ para as bactérias, resultando em redução da sobrevivência dessas.

O EA na cultivar TMG 7062 para o tratamento com a aplicação de Co e Mo no tratamento de sementes e sem adição do osmoprotetor apresentou maior germinação das sementes comparadas a aplicação de osmoprotetor, Co e Mo em conjunto (Tabela 5, Figura 2). Isso pode ter ocorrido de forma análoga a descritas para as variáveis CPA e CE da NS 5959.

Figura 2 - Envelhecimento acelerado (EA, %) e vigor de sementes (VG, %) em função da aplicação de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo para a cultivar TMG 7062 INTACTA.



*Médias não seguidas da mesma letra, maiúsculas barra preta x cinza e minúsculas dentro das barras de mesma coloração, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à análise nos tecidos foliares do teor de proteína, atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD), clorofilas totais e carotenóides observou-se que nas três últimas variáveis não houve efeito significativo dos tratamentos (Tabela 4). Para a enzima POD, isso pode ter ocorrido pelo momento da avaliação, pois a planta não apresentava sinais de estresse, indicando que estavam cultivadas sob condições favoráveis para seu desenvolvimento, mesmo no tratamento testemunha. Nessas condições as espécies reativas de oxigênio (ERO) continuaram sendo produzidas, porém em níveis basais que foram eliminadas facilmente por diferentes mecanismos antioxidantes, inclusive pela enzima POD, sendo, portanto, incapazes de causar danos (FOYER; NOCTOR, 2005). Com relação aos pigmentos fotossintéticos, a ausência de efeito significativo da co-inoculação pode sugerir que o N adicional fornecido pela co-inoculação possivelmente foi direcionado à síntese de outras moléculas, como proteínas, indicando que a quantidade disponível no solo foi suficiente à produção de clorofilas em concentração compatível às necessidades metabólicas das plantas no momento da avaliação.

Já o teor de proteína foliar apresentou-se superior nas folhas das plantas co-inoculadas. Resultados semelhantes também foram observados por Egamberdieva et al. (2017) com a utilização de *Bradyrhizobium*. Esses reforçam os resultados apresentados para o lote de sementes, onde o teor de proteínas nas sementes também foi maior, indicando que uma planta bem nutrida repassa suas características aos seus descendentes. O N em sua maioria provém

da co-inoculação e é extremamente necessário na formação de proteínas e nas reações enzimáticas que ocorrem na planta, tendo influencia no processo de fotossíntese (ZHOU et al., 2006).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, representada pelos quadrados médios das variáveis explicativas: teor de proteína (mg ml^{-1}), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD, U mg^{-1} proteína), teor total de clorofila (Chl Total, mg g^{-1} FW) e teor de carotenóides (mg g^{-1} FW).

FV	GL	Proteínas	POD	Chl Total	Carotenóides
NS 5959 IPRO					
Blocos	2	0.15	0.74	0.01	0.00
Tratamentos	6	0.67*	19.40*	0.11*	0.00
Fatorial	5	0.25*	22.73*	0.13*	0.00
Contraste	1	2.78*	2.79	0.02	0.00
Erro	12	0.06	3.16	0.01	0.00
Média Testemunha		4.88	11.55	1.99	0.42
CoMo (D)	2	0.23	8.67	0.24	0.00*
Osmoprotetor (C)	1	0.56	20.5	0.12	0.00
DxC	2	0.12	37.90*	0.02	0.00
Média		5.92	10.51	1.90	0.40
CV (%)		3.99	16.91	5.70	12.00
TMG 7062 INTACTA					
Blocos	2	0.16	6.5	0.01	0.00
Tratamentos	6	2.61*	2.31	0.03	0.00
Fatorial	5	3.11*	1.96	0.03	0.00
Contraste	1	0.11	4.04	0.01	0.00
Erro	12	0.46	3.28	0.07	0.00
Média Testemunha		5.64	6.23	1.95	0.39
CoMo (D)	2	1.38	1.11	0.01	0.00
Osmoprotetor (C)	1	9.04	7.48*	0.00	0.00
DxC	2	1.86*	0.06	0.07	0.00
Média		5.84	7.48	2.02	0.41
CV (%)		11.66	24.21	12.78	11.27

*significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Coeficiente de variação (CV%).

Na obtenção de maiores produtividades, tecnologias vêm sendo estudadas, como a utilização de bactérias que são capazes de realizar associações com as plantas trazendo benefícios para o crescimento, desenvolvimento e produtividade final dessas, como é o caso do *Azospirillum* (FUKAMI et al., 2016; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; PUENTE et al.,

2018). Porém, o primeiro passo, para obtenção de plantas mais produtivas é por meio da utilização de sementes de qualidade. Segundo França-Neto, Krzyzanowski e Henning (2012), a utilização de sementes de alto vigor pode incrementar em até 10% na produtividade final de grãos da cultura da soja. Nessa pesquisa observou-se que a co-inoculação anual das sementes da planta genitora manteve a qualidade das sementes produzidas por ela.

Em relação a aplicação dos micronutrientes Co e Mo juntamente com o tratamento de sementes (fungicida + inseticida) proporcionou manutenção da qualidade fisiológica das sementes, inferindo que não houve incompatibilidade entre bactérias e o TS. Esse fato é importante, pois a realização desses manejos é preconizada nas sementes pelos produtores.

Contudo, as respostas dependem da cultivar utilizada, ou seja, da genética e interação entre planta-bactéria, pois segundo Kuzmicheva et al. (2017) a resposta das plantas às bactérias é influenciada por diferentes quantidades e/ou qualidades dos exsudatos radiculares liberados e pelas diferentes capacidades das bactérias metabolizá-las ou transformá-las. Destaca-se, portanto, a necessidade de pesquisas quanto às diferentes cultivares e a compatibilidade de aditivos, polímeros, osmoprotetores, entre outras substâncias e bactérias inoculadas utilizadas no tratamento de sementes.

CONCLUSÃO

A co-inoculação anual de soja aumenta o teor de proteína foliar e mantém a qualidade fisiológica de sementes da próxima geração de sementes.

A aplicação de cobalto e molibdênio no tratamento de sementes na ausência de osmoprotetor promove aumento da CPA e redução da CE para a cultivar NS 5959 em relação a utilização somente de co-inoculação.

O osmoprotetor aliado ao tratamento com cobalto e molibdênio nas sementes reduz o vigor de sementes submetidas à EA para a cultivar TMG 7062.

A aplicação de Co e Mo via tratamento de sementes na co-inoculação melhora o desempenho de plantas e obtenção de sementes de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 527-534, 2001.
- ALVAREZ, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ARAÚJO, R. S. et al. Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: Technological innovation for large-scale agriculture. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1-11, 2017.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BASHAN, Y. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279-285, 2006.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. In: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, MAPA/ACS. 2009. 395p.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. **Field Crops Research**, v. 110, n. 3, p. 219-224, 2009.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. Contribution of nitrogen derived from mineral supplementation for soybean seedlings. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 1, p. 33-41, 2018.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 53, 2014.
- DEAKER, R.; HARTLEY, E.; GEMELL, G. Conditions affecting shelf-life of inoculated legume seed. **Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 38-51, 2012.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 573-580, 2007.

- DE LUCA, M. J.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Feasibility of lowering soybean planting density without compromising nitrogen fixation and yield. **Agronomy Journal**, v. 106, n. 6, p. 2118-2124, 2014.
- DOURADO NETO, D. et al. Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 2741-2752, 2012.
- DWIVEDI, S. L. et al. Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. **Advances in Agronomy**, v. 129, p. 1-116, 2015.
- EGAMBERDIEVA, D. et al. Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 100-107, 2017.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, 2013. 353p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of Soybean Development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p.
- FERREIRA, A. S. et al. Plant density and mineral nitrogen fertilization influencing yield, yield components and concentration of oil and protein in soybean grains. **Bragantia**, v. 75, n. 3, p. 362-370, 2016.
- FIPKE, G. M. et al. Co-inoculation with diazotrophic bacteria in soybeans associated to urea topdressing. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 5, p. 522-533, 2016.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.
- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Plantas de alto desempenho e a produtividade da soja. **Seed News**, v.16, n.6, p.8-11, 2012.
- 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, p. 1-13, 2017.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 4-13, 2016.
- GALINDO, F. S. et al. Modes of application of cobalt, molybdenum and *Azospirillum brasilense* on soybean yield and profitability. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 180-185, 2017.
- GAO, Y.; MA, B. L. Nitrogen, phosphorus, and zinc supply on seed and metal accumulation in canola grain. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 473-483, 2015.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOLO, A. L. et al. Qualidade das sementes de soja com a aplicação de diferentes doses de molibdênio e cobalto. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 40-49, 2009.

GOYOAGA, C. et al. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 391-397, 2011.

GRÖNEMEYER, J. L. et al. Rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa: diversity, adaptations, and host specificity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 23, p. 7244-7257, 2014.

HAN, C. et al. Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013.

HARTLEY, E. J.; GEMELL, L. G.; DEAKER, R. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed. **Crop and Pasture Science**, v. 63, n. 9, p. 858-865, 2013.

HELDWEIN, A. B.; BURIOL, A. G.; STRECK, N. A. O clima de Santa Maria. **Ciência & Ambiente**, v. 38, n. 1, p. 43-58, 2009.

HILLE, R. The molybdenum oxotransferases and related enzymes. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 9, p. 3029-3042, 2013.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.) **Biological Nitrogen Fixation**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. cap. 99, p.1009-1023. DOI: 10.1002/9781119053095.ch99.

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, n. 6, p. 811-817, 2015.

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. 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. 1-2, p. 413-425, 2010.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Nitrogenase assembly. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1827, n. 8-9, p. 1112-1122, 2013.

- JAYAKUMAR, K. et al. Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of *Glycine max* (L.) Merr. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 272-275, 2008.
- KAHLON, C. S.; BOARD, J. E.; KANG, M. S. An analysis of yield component changes for new vs. old soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v. 103, n. 1, p. 13-22, 2011.
- KIM, H. T. et al. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 9, p. 1178-1187, 2011.
- KRUEGER, K. et al. Phosphorus and potassium fertilization effects on soybean seed quality and composition. **Crop Science**, v. 53, n. 2, p. 602-610, 2013.
- KUZMICHEVA, Y. V. et al. Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean. **Plant and Soil**, v. 419, n. 1-2, p. 83-96, 2017.
- LI, J. et al. Effects of fumigation with metam-sodium on soil microbial biomass, respiration, nitrogen transformation, bacterial community diversity and genes encoding key enzymes involved in nitrogen cycling. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 1027-1036, 2017.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.
- LOEFFLER, L. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, v.12, n.1, p.37-53, 1988.
- MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3. ed. London: Elsevier, 2012. 672p. DOI:org/10.1016/C2009-0-63043-9
- MARCOS FILHO, J. Importância do potencial fisiológico da semente de soja. **Informativo Abrates**, v. 23, n. 1, 2013.
- MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 421-426, 2001.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.
- MARIN, R. da S. F. et al. Efeito da adubação fosfatada na produção de sementes de soja. **Revista Ceres**, v. 62, n. 3, p. 265-274, 2015.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH Jr, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363-384, 2014.
- MUNIER-JOLAIN, N.; LARMURE, A.; SALON, C.. Determinism of carbon and nitrogen reserve accumulation in legume seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 780-787, 2008.

- MUS, F. et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.
- NARASIMHAN, R. et al. Differential changes in galactolipid and phospholipid species in soybean leaves and roots under nitrogen deficiency and after nodulation. **Phytochemistry**, v. 96, p. 81-91, 2013.
- NKOT, L. N. et al. Abundance of legume nodulating bacteria in soils of diverse land use systems in Cameroon. **Universal Journal of Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 97–108, 2015.
- 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.
- PUENTE, M. L. et al. Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. **Symbiosis**, p. 1-7, 2018.
- RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, n. 4, p. 281-296, 2009.
- RINCKER, K. et al. Genetic improvement of US soybean in maturity groups II, III, and IV. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1419-1432, 2014.
- SHAHID, M. et al. In vitro investigation to explore the toxicity of different groups of pesticides for an agronomically important rhizosphere isolate *Azotobacter vinelandii*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 33-44, 2019.
- SILVA, K. et al. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* pre-inoculation in association with chemical treatment of soybean seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 14, p. 726-732, 2018.
- SILVA, A. F. et al. Inoculação com *Bradyrhizobium* e formas de aplicação de cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 98- 104, 2011.
- SINGH, S. K. et al. Growth, nutrient dynamics, and efficiency responses to carbon dioxide and phosphorus nutrition in soybean. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 838-849, 2014.
- SONG, W. et al. Analyzing the effects of climate factors on soybean protein, oil contents, and composition by extensive and high-density sampling in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 20, p. 4121-4130, 2016.
- STEEL, R. G. D.; TORREI, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3. ed. New York: McGraw Hill Book, 1997. 666 p.

- TAHIR, M. et al. Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 9, p. 1284, 2013.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of beta.-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n.3, p. 692-695, 1978.
- THILAKARATHNA, M. S.; RAIZADA, M. N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 177-196, 2017.
- TEIXEIRA, I. R. et al. Teores de nutrientes e qualidade fisiológica de sementes de feijão em resposta à adubação foliar com manganês e zinco. **Bragantia**, v. 64, n. 1, p. 83-88, 2005.
- USDA – Soil Survey Staff. **Keys to Soil Taxonomy – a basic system of soil classification for making and interpreting soil survey**. 10 ed. Washington: USDA. 2006. 341 p.
- VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLEN, D.L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v.157, p.423-447, 2003.
- VIEIRA, R. D. et al. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, 2002.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.
- WIJewardana, C.; REDDY, K. R.; BELLALOU, N. Soybean Seed Physiology, Quality, and Chemical Composition under Soil Moisture Stress. **Food Chemistry**, v. 278, p. 92-100, 2019.
- WILSON, E. W. et al. Genetic gain x management interactions in soybean: II. Nitrogen utilization. **Crop Science**, v. 54, n. 1, p. 340-348, 2014.
- WOLF, W. Soybean ultrastructure and its relationship to processing. In: **Symposium: seed proteins**. AVI Pub. Co.: Westport, 1972. p. 231-241.
- WU, M. et al. Rational dose of insecticide chlorantraniliprole displays a transient impact on the microbial metabolic functions and bacterial community in a silty-loam paddy soil. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 236-244, 2018.
- ZARKADAS, C. G. et al. Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 129-146, 2007.

ZHOU, X.-J. et al. Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. **Photosynthetica**, v. 44, n. 4, p. 530-535, 2006.

ZHOU, W. et al. DA-6 promotes germination and seedling establishment from aged soybean seeds by mediating fatty acid metabolism and glycometabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 101-114, 2018.

ZIMMER, S. et al. Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. **European Journal of Agronomy**, v. 72, p. 38-46, 2016.

ZUIL, S. G. et al. Oil quality of maize and soybean genotypes with increased oleic acid percentage as affected by intercepted solar radiation and temperature. **Field Crops Research**, v. 127, p. 203-214, 2012.

5 ARTIGO 3 - RELAÇÕES ENTRE CARACTERES DA PLANTA, DA SEMENTE E FISIOLÓGICAS NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

As correlações canônicas estimam as relações entre grupos de variáveis de importância agrônoma, permitindo um melhor direcionamento no estudo de grande número de caracteres. Objetivou-se identificar as correlações canônicas entre as características de semente, fisiológicas e da planta na cultura da soja, e dentro de cada grupo de características as correlações lineares de Pearson. Foram conduzidos experimentos na safra 2017/2018 com as cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA. O delineamento experimental foi de blocos aos acasos para o campo e inteiramente casualizado em laboratório, com quatro e três repetições, envolvendo um bifatorial (2 x 3) + 1 constituído por utilização ou não de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo nas sementes, foliar ou sem sua aplicação + testemunha (semente com fungicida e inseticida). Os grupos canônicos foram estabelecidos entre os caracteres de planta (massa e número de nódulos, massa seca de parte aérea, número de legumes, massa de mil grãos e produtividade de grãos) e o de semente (comprimento de parte aérea e raiz, massa seca de plântula, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, primeira contagem e germinação), variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão e na folha, carotenóides e atividade da enzima guaiacol peroxidase) e o grupo de variáveis da planta, e fisiológicas e semente. A correlação entre os grupos foi dependente da cultivar. Na cultivar ND 5959 IPRO, aumento da massa seca de parte aérea, massa de mil grãos e produtividade de grãos foram determinantes para a menor condutividade elétrica e maior comprimento de parte aérea, envelhecimento acelerado, primeira contagem e germinação das sementes. Na mesma cultivar as plantas com maior massa de mil grãos e produtividade são determinantes no aumento da proteína no grão e na folha. A análise de correlações canônicas mostra que os grupos de variáveis da planta, das sementes e fisiológicas não são independentes, definindo as características que devem ser priorizadas nas avaliações.

Palavras-chave: *Glycine max*, relações entre componentes, análise multivariada, componentes de produtividade, qualidade de sementes.

RELATIONSHIP BETWEEN PLANT, SEED AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERS IN SOYBEAN CULTURE

ABSTRACT

Canonical correlations estimate the relationships between groups of variables of agronomic importance, allowing better direction in the study of a large number of characters. The objective was to identify the canonical correlations between the seed, physiological and plant characteristics in soybean culture, and within each group of characteristics Pearson correlation coefficient. Experiments were conducted in the 2017/2018 crop with the cultivars NS 5959 IPRO and TMG 7062 INTACTA. The experimental design was randomized blocks for the field and entirely randomized in the laboratory, with four and three replications, involving a bifactorial (2 x 3) + 1 constituted by the use or not of osmoprotector and application of Co and Mo in the seeds, leaf or without its application + control (seed with fungicide and insecticide). The canonical groups were established between the plant characters (mass and number of nodules, dry mass of aerial part, number of pods, mass of a thousand grains and grain yield) and the seed (length of aerial part and root, dry mass seedling, accelerated aging, electrical conductivity, first count and germination); physiological variables (protein content in the grain and leaf, carotenoids and activity of the enzyme guaiacol peroxidase) and the group of plant variables; and physiological and seed. The correlation between the groups was dependent on the cultivar. In cultivar ND 5959 IPRO, increase in the dry mass of aerial part, mass of a thousand grains and grain yield were determinant for the lower electrical conductivity and greater length of aerial part, accelerated aging, first count and seed germination. In the same cultivate the plants with greater mass of a thousand grains and productivity are determinant in the increase of the protein in the grain and in the leaf. The analysis of canonical correlations shows that the groups of plant, seed and physiological variables are not independent, defining the characteristics that should be prioritized in the evaluations.

Keywords: *Glycine max*, component relationships, multivariate analysis, yield components, seed quality.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a oleaginosa mais consumida no mundo devido ao alto teor de proteína presente nos grãos. Contudo, a produtividade e a produção mundial devem aumentar, visto que a população estimada até o ano de 2050 alcance os 9,7 bilhões de habitantes (UNITED NATIONS, 2019), e as áreas para expansão do cultivo são limitadas. Além disso, há crescente demanda do grão em substituição as proteínas de origem animal, o que coloca em pauta o aumento de produtividade em conjunto com a qualidade proteica dos grãos.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja, possuindo uma capacidade limitada de área para expansão, mas com possibilidades consideráveis de aumento da produtividade por área. Na safra de 2019/2020, o Brasil pode ultrapassar os Estados Unidos como o principal produtor do grão (USDA, 2020). Além disso, o Brasil utiliza tecnologias sustentáveis para o cultivo, como a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio que podem fornecer até 94% do nitrogênio (N) necessário para o crescimento e desenvolvimento da soja (HUNGRIA et al., 2005). Com isso, os avanços tecnológicos incorporados a cadeia produtiva como o uso de cultivares com elevado potencial produtivo e adoção de práticas de manejo foram importantes para o aumento da produtividade (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015; MACHOLDT; HONERMEIER, 2017). Contudo, a expressão do potencial produtivo da cultura depende de vários fatores como manejos de doenças (GABRIEL et al., 2018; KNEBEL et al., 2019), condições climáticas (temperatura, radiação e precipitação) (LENG et al., 2016; ZANON, STRECK, GRASSINI, 2016), manejo de adubação (LA MENZA et al., 2017; RIEDELL et al., 2013), entre outros.

Dentre os componentes que compõe a produtividade de grãos, o estande de plantas no campo é primeiro deles e está relacionado com a qualidade de sementes que por sua vez é dependente das condições que as plantas genitoras foram expostas (RAO; DULLO; ENGELS, 2017; REDDY et al., 2016; WIJewardana; REDDY; BELLALOU, 2019). Para tanto, são empregados manejos durante todo o ciclo da cultura visando condições ideais para crescimento e desenvolvimento das plantas a campo que darão origem a nova semente/grão de qualidade.

Portanto, é necessário melhor entendimento dos efeitos das tecnologias durante todo o ciclo da planta, a fim de determinar relações entre as características agronômicas de semente, fisiológicas e da planta e adequar os manejos dependendo da destinação para indústria e das cultivares que serão utilizadas. A definição da cultivar é importante, pois há diferenças

genéticas entre elas, fazendo com que ocorram distintas respostas aos tratamentos/ambientes em que irão se desenvolver.

Nesse sentido, a utilização de análises multivariadas como o estudo das correlações canônicas permite agrupar variáveis de interesse, de maneira à determinação das associações entre os grupos que possibilitem a seleção indireta de caracteres agronômicos (CRUZ et al., 2012). Essa determinação facilitará pesquisas posteriores pela redução do número de variáveis analisadas e também fornecer opção do grupo a ser estudado de acordo com a disponibilidade de material, facilidade de mensuração e tempo para as avaliações.

Estudos em culturas de trigo, soja, milho e videira foram realizados utilizando a análise de correlações canônicas e associações foram identificadas entre grupos de características. No trigo o diâmetro dos colmos e número de perfilhos devem ser priorizados no aumento da produtividade e da massa hectolétrica (CARVALHO et al., 2015). Na soja maior produtividade foi correlacionada com maior número de legumes, e sementes com alto teor de óleo com as de alta porcentagem de germinação e taxa de emergência (PEREIRA et al., 2017). Em videira a qualidade e a quantidade de uvas para a produção de vinhos é específica para cada variedade (CARGNIN, 2019). Contudo, as relações entre caracteres na cultura da soja não são exploradas suficientemente considerando as correlações canônicas entre características de semente, fisiológicas e da planta. Diante do exposto, objetivou-se identificar as correlações canônicas entre as características de semente, fisiológicas e da planta da cultura da soja, e dentro de cada grupo de características as correlações lineares de Pearson.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais, localizada no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), latitude 29°43'2.81" S e longitude 53°43'58.28" O com uma altitude de 116 metros. O clima da região segundo a classificação de Köppen é 86,7% Cfa e 13,3% Cfb (ALVAREZ et al., 2013).

O solo da área é classificado como Argissolo Vermelho distrófico arênico (EMBRAPA, 2013). A análise química do solo na camada de 0-10 cm apresentou como características solo com pH (água, 1:1) = 5,7; matéria orgânica (% m/v) = 2,0; argila (% m/v) = 21; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 35,9; potássio (cmol_c dm⁻³) = 0,153; H + Al (cmol_c dm⁻³) = 3,9; CTC (pH 7, cmol_c dm⁻³) = 11,8; saturação de bases (%) = 67,0. A partir

dessa análise foi realizada a adubação da área com os macronutrientes P_2O_5 e K_2O para expectativa de cinco toneladas de produtividade de soja por hectare.

As cultivares de soja utilizadas foram NS 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA, com densidades de semeadura de 37 e 26 sementes m^{-2} respectivamente. Os tratamentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições segundo um bifatorial $(2 \times 3) + 1$ constituído pela utilização ou não de osmoprotetor e aplicação de Co e Mo via TS, foliar em V3 ou sem sua aplicação, totalizando seis tratamentos e a testemunha (semente com fungicida e inseticida). Cada unidade experimental foi constituída de 7,75 m de comprimento por 2,25 m de largura, com cinco fileiras espaçadas 0,45 m, totalizando 17,4 m^2 de área total e 6,75 m^2 de área útil.

No tratamento químico das sementes foi utilizado Piraclostrobina 25g i.a L^{-1} + Tiofanato metílico 225g i.a L^{-1} + Fipronil 250g i.a L^{-1} (Standak[®] Top). Do Mo e Co nas sementes foi utilizado 20 mL ha^{-1} e 2 mL ha^{-1} , respectivamente e quando aplicados via foliar em V3 foi utilizado o dobro das doses. Do osmoprotetor (água, metabólicos ativos de bactérias, complexo de açúcares e biopolímeros) foram aplicados 1 mL kg^{-1} de sementes. A co-inoculação foi realizada com inoculante líquido a base da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* com concentração de 7×10^9 UFC mL^{-1} e *Azospirillum brasilense* com 2×10^8 UFC mL^{-1} . Todos com as doses recomendadas pelos fabricantes.

No campo as variáveis analisadas foram: no estágio fenológico R2 (pleno florescimento, uma flor aberta num dos dois últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida) (FEHR; CAVINESS, 1977): número de nódulos (NNP, $planta^{-1}$): contagem direta de nódulos na raiz principal e secundárias de cada planta; massa seca de nódulos por planta (MSN, $mg\ planta^{-1}$): lavagem dos nódulos com posterior secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 48 horas e pesadas; massa seca de planta (MPA, $g\ planta^{-1}$): partes aéreas das mesmas plantas utilizadas para MSN, secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 48 horas e pesadas; proteína nas folhas (Protfolha, $mg\ mL^{-1}$): determinado segundo Bradford (1976): utilizando albumina sérica bovina como padrão; atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD, $U\ mg^{-1}\ proteína$) (ZERAİK et al., 2008); Carotenóides (Carot, $mg\ g^{-1}\ FW$): extraídos das folhas pelo método de Hiscox e Israelstan (1979) e estimados usando a equação de Lichtenthaler (1987). Na maturação plena da cultura (R8): número de legumes por planta (NLP, $planta^{-1}$); produtividade de grãos (PG, $kg\ ha^{-1}$) e massa de mil grãos (MMG, g) (base 13% de umidade).

Após a colheita das sementes as repetições de cada tratamento foram agrupadas formando uma amostra única, sendo as variáveis analisadas em delineamento inteiramente

casualizado: teor de proteína dos grãos (Protgrão): espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS); germinação de sementes (GE), primeira contagem (PC) (BRASIL, 2009); comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA) e massa seca de planta (MS) (NAKAGAWA, 1999); envelhecimento acelerado (EA): (MARCOS FILHO; NOVEMBRE; CHAMMA, 2001).

ANÁLISE DE DADOS

Os dados primeiramente foram analisados pela correlação linear de Pearson para cada cultivar dentro de cada tipo de situação (variáveis da planta (NNP, MNP, MPA, NLP, MMG, PG), variáveis da semente (CPA, CR, MS, EA, CE, PC, GE) e variáveis fisiológicas (Protgrao, Protfolha, POD, Carot)) (STEEL; TORRIE; DICKEY, 1997). Após, foram realizadas as análises de correlação canônica com vistas a identificar relações entre grupos de variáveis. A estimação da máxima correlação entre combinações lineares de variáveis do grupo I e II, sendo X_1 e Y_1 as combinações lineares das variáveis dos grupos I e II respectivamente tem-se que: $X_1 = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_px_p$ e $Y_1 = b_1y_1 + b_2y_2 + \dots + b_qy_q$ em que: $a' = [a_1 a_2 \dots a_p]$ = vetor 1xp de pesos do carácter do grupo I e $b' = [b_1 b_2 \dots b_q]$ = vetor 1xq de pesos das variáveis do II. Desta forma, a primeira correlação canônica será aquela que maximiza a relação entre X_1 e Y_1 . As funções X_1 e Y_1 formam o primeiro par canônico associado aquela correlação canônica expressa por: $r_1 = \frac{C\hat{ov}(X_1, Y_1)}{\sqrt{\hat{V}(X_1) \cdot \hat{V}(Y_1)}}$, sendo

$C\hat{ov}(X_1, Y_1) = a' S_{12} b$, $\hat{V}(X_1) = a' S_{11} a$ e $\hat{V}(Y_1) = b' S_{22} b$ em que: S_{11} = matriz p x p de covariâncias entre as variáveis do grupo I; S_{22} = matriz q x q de covariâncias entre as variáveis do grupo II; S_{12} = matriz p x q de covariâncias entre os variáveis do grupo I e II (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Os grupos formados foram de variáveis de semente, variáveis da planta e variáveis fisiológicas. Realizou-se o diagnóstico de multicolinearidade dentro de cada grupo de variáveis pelo número de condição (NC), que representa a razão entre o maior e o menor autovalor da matriz de correlação $X'X$ (MONTGOMERY & PECK, 1982). Quando o NC resultante dessa divisão for $NC < 100$, a multicolinearidade é fraca; se $100 < NC < 1000$, a multicolinearidade é moderada a forte; e se $NC > 1000$, a multicolinearidade é severa (CRUZ; REGAZZI, 1994). Assim, em todos os grupos formados a multicolinearidade foi baixa. Os grupos correlacionados foram variáveis da planta (NNP, MNP, MPA, NLP, MMG, PG) e o

grupo de variáveis da semente (CPA, CR, MS, EA, CE, PC, GE), variáveis fisiológicas (Protgrão, Protfolha, POD, Carot) e o grupo de variáveis da planta (NNP, MNP, MPA, NLP, MMG, PG), e fisiológicas e semente. As análises estatísticas foram realizadas a 5% de significância e com auxílio dos pacotes *pracma* (BORCHERS, 2019), *faraway* (FARAWAY, 2016) e *yacca* (BUTTS, 2018), implementados no software R (R CORE TEAM, 2019).

RESULTADOS

A análise de correlação de Pearson para as variáveis de semente apresentou significância positiva na cultivar NS 5959 IPRO entre os pares EA x CR, PC x EA, GE x EA, GE x PC e negativa para CE x EA, PC x CE, GE x CE. Na TMG 7062, as positivas foram MS x CPA, MS x CR, PC x CR, PC x MS, GE x CR, GE x PC e negativas CE x CR, CE x MS, PC x CE e GE x CE. Para a variável CE valores mais baixos representam maior vigor de sementes, sendo de interesse a significância negativa com as demais variáveis (Tabela 1).

Nas variáveis do campo, as correlações foram significativas e positivas entre os pares MNP x NNP, PG x MPA, PG x NLP e PG x MMG em ambas as cultivares, e MPA x MNP somente na TMG 7062. Ressalta-se que as variáveis que influenciaram significativamente a PG são as responsáveis pelos componentes de produtividade da cultura. Quanto à correlação entre as variáveis fisiológicas para ambas as cultivares observou-se que quanto maior o Chltotal maior também será o Carot. Para a NS 5959 Protgrão X Protfolha a correlação foi positiva e Chltotal x POD negativa (Tabela 1).

Tabela 1 - Correlação linear de Pearson entre variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG)), da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) e fisiológicos (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) para as cultivares ND 5959IPRO e TMG 7062 INTACTA.

ND 5959 IPRO								TMG 7062 INTACTA							
Semente								Semente							
	CPA	CR	MS	EA	CE	PC	GE		CPA	CR	MS	EA	CE	PC	GE
CPA	1	0.05	0.17	0.29	0.03	0.12	0.14	CPA	1	-0.1	0.55*	0.14	0.04	0.02	-0.33
CR		1	-0.08	0.46*	-0.28	0.29	0.23	CR		1	0.50*	0.12	-0.73*	0.74*	0.63*
MS			1	0.02	0.21	-0.14	0.03	MS			1	0.06	-0.56*	0.34*	0.07
EA				1	-0.48*	0.55*	0.48*	EA				1	-0.1	0.11	0.07
CE					1	-0.66*	-0.51*	CE					1	-0.57*	-0.43*
PC						1	0.76*	PC						1	0.64*
GE							1	GE							1
Planta								Planta							
	NNP	MNP	MPA	NLP	MMG	PG		NNP	MNP	MPA	NLP	MMG	PG		
NNP	1	0.59*	0.16	0.13	0.22	0.26	NNP	1	0.6*	0.11	-0.15	0.23	-0.1		
MNP		1	0.15	0.07	0.19	0.16	MNP		1	0.52*	0.12	0.26	0.04		
MPA			1	0.16	0.19	0.36*	MPA			1	0.18	0.19	0.36*		
NLP				1	0.35	0.75*	NLP				1	0.13	0.53*		
MMG					1	0.57*	MMG					1	0.43*		
PG						1	PG						1		
Fisiológicos								Fisiológicos							
	PrFolha	POD	Chltotal	Carot.	Prgrão			PrFolha	POD	Chl total	Carot.	Prgrão			
PrFolha	1	-0.14	0.22	0.01	0.70*	PrFolha	1	0.04	-0.22	-0.09	0.37				
POD		1	-0.45*	-0.21	-0.14	POD		1	0.33	0.4	-0.13				
Chltotal			1	0.48*	0.25	Chl total			1	0.82*	0.05				
Carot.				1	0.11	Carot.				1	-0.13				
Prgrão					1	Prgrão					1				

*Significativo pelo teste t (n=28, campo e sementes; n=21 fisiológicos), a 5% de probabilidade.

Para a análise de correlação canônica foi testado primeiramente a multicolinearidade, onde foi baixa em todos os grupos formados, sendo que para a cultivar ND 5959 o NC foi 6.08, 22.13 e 16.91 para o grupo de variáveis fisiológicos, variáveis da planta e variáveis de semente respectivamente. Para a cultivar TMG 7062 o NC foi 2.85, 12.21 e 25.83 para o grupo de variáveis fisiológicos, variáveis da planta e variáveis de semente respectivamente. A análise de correlações canônicas foi interpretada primeiro utilizando o nível de significância da função, e caso significativa, considerou-se a magnitude da correlação canônica.

Para a cultivar ND 5959, as correlações entre os grupos de variáveis da planta e o grupo de variáveis de semente apresentou os primeiros pares de correlações canônicas altos, no entanto apenas o 1º par canônico foi significativo (0.96), mostrando que estes grupos são dependentes e que podem ser utilizados para estudar as variáveis destes grupos. Pelas cargas cruzadas canônicas do primeiro par canônico ficou evidenciado a relação entre plantas com maiores MPA, MMG e PG, variáveis do grupo I são determinantes no aumento do vigor das sementes (caracterizados pelo menor CE e maior CPA, EA, PC), e da germinação pelo maior GE (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG) e o grupo de variáveis da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA.

Variáveis	NS 5959 IPRO						TMG 7062 INTACTA						
	Cargas cruzadas canônicas												
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
	Variáveis da planta												
NNP	-0.13	-0.3	0.11	-0.14	-0.05	0.28	-0.12	0.42	0.24	-0.29	0.07	0.04	
MNP	-0.21	-0.52	0.19	0.22	-0.18	0.13	-0.05	0.32	-0.15	-0.44	-0.03	-0.02	
MPA	0.56	0.26	0.32	0.29	-0.09	0.1	0.47	0.28	-0.41	-0.18	0.03	-0.02	
NLP	0.47	-0.48	0.28	0.04	0.22	0.03	0.31	0.31	0.2	0.12	-0.17	-0.06	
MMG	0.72	-0.39	0.02	-0.22	-0.11	-0.01	0.17	0.28	-0.22	0.09	-0.27	0.05	
PG	0.76	-0.3	-0.01	0.11	0.09	0.13	0.67	0	0.09	-0.02	-0.26	0.01	
	Variáveis da Semente												
CPA	0.55	-0.43	0.15	0.29	0.14	0.01	-0.34	0.43	0.18	-0.04	0.04	-0.07	
CR	0.4	0.15	0.43	0.08	-0.23	-0.1	-0.25	-0.15	-0.07	-0.34	-0.11	0.02	
MS	0.07	0.23	0.38	0.21	-0.02	0.16	-0.77	0.12	-0.1	-0.17	-0.08	-0.02	
EA	0.66	-0.31	0.06	-0.11	-0.25	-0.01	0.19	0.5	-0.3	-0.23	-0.04	0.02	
CE	-0.71	-0.17	0.07	0.24	0.01	0.15	0.46	-0.02	-0.11	0.16	0.28	-0.04	
CP	0.71	0.16	-0.09	-0.16	-0.06	0.08	-0.25	-0.02	0.18	-0.28	0.06	0.06	
GE	0.7	0.26	-0.27	0.12	-0.15	0.05	0	-0.32	0.12	-0.39	0.04	0.05	
Correlação canônica	0.96	0.82	0.76	0.6	0.42	0.32	0.87	0.69	0.66	0.54	0.43	0.11	
Graus de liberdade	42	30	20	12	6	2	42	30	20	12	6	2	
p-valor	0.01	0.26	0.42	0.63	0.68	0.5	0.58	0.83	0.8	0.85	0.84	0.92	

Para as análises de correlações canônicas entre os grupos de variáveis fisiológicos e da planta, fisiológico e de semente para ambas cultivares e para a TMG 7062 entre variáveis de semente e planta, os pares canônicos não apresentam significância (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 3 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) e o grupo de variáveis da planta (número de nódulos (NNP), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MPA), massa de mil grãos (MMG), número de legumes (NLP) e produtividade de grãos (PG)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062 INTACTA.

Variáveis	NS 5959 IPRO				TMG 7062 INTACTA			
	Cargas cruzadas canônicas							
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
	Variáveis Fisiológicas							
Protgrao	0.68	0.37	-0.07	0	-0.26	0.47	0.05	-0.03
Protfolha	0.69	0.05	0.25	-0.08	0.57	0.29	0.01	-0.04
POD	0.19	-0.55	-0.24	0.15	0.22	0.17	-0.17	0.07
Carot	-0.04	0.29	0.22	0.31	0.21	0.07	0.14	0.08
	Variáveis da Planta							
NNP	-0.07	0.16	-0.3	-0.09	0.03	-0.15	-0.18	0.05
MNP	-0.15	0.45	-0.32	0.07	-0.28	-0.43	-0.11	0
MPA	0.11	0.14	-0.15	-0.29	-0.59	-0.26	0.06	-0.02
NLP	0.48	-0.24	-0.27	0.05	-0.23	0.19	-0.07	-0.05
MMG	0.67	0.14	-0.22	0.01	-0.26	0.05	0.13	0.05
PG	0.64	0.07	-0.13	-0.13	-0.63	0.27	-0.01	0.01
Correlação canônica	0.8	0.71	0.53	0.39	0.79	0.54	0.29	0.09
Graus de liberdade	24	15	8	3	24	15	8	3
p-valor	0.13	0.3	0.51	0.5	0.66	0.97	0.99	0.98

Tabela 4 - Correlações canônicas entre o grupo de variáveis fisiológicas (teor de proteína no grão (Protgrão), teor de proteína na folha (Protfolha), atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e teor de carotenóides (Carot)) e o grupo de variáveis da semente (comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de planta (MS), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC), germinação (GE)) para a cultivar de soja ND 5959 IPRO e TMG 7062.

Variáveis	ND 5959 IPRO				TMG 7062 INTACTA			
	Cargas cruzadas canônicas				Cargas cruzadas canônicas			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
	Variáveis Fisiológicas							
Protgrao	-0.7	-0.22	-0.11	0.12	0.46	0.93	0.33	-0.04
Protfolha	-0.76	-0.2	0.24	0.03	0.56	-0.55	-0.61	-0.43
POD	-0.21	0.72	-0.09	-0.04	0.09	-0.24	0.92	-0.56
Carot	0.26	0.08	0.21	0.2	0.61	-0.17	-0.09	0.89
	Variáveis da Semente							
CPA	-0.37	-0.07	-0.39	-0.04	0.18	-0.55	1.47	0.01
CR	0	-0.15	-0.01	0.07	-0.38	-0.54	0.49	0.96
MS	0.21	-0.29	0.05	-0.12	0.03	-0.65	-1.39	-0.2
EA	-0.62	-0.24	-0.05	0.09	-0.6	0.33	0.2	-0.13
CE	0.61	-0.27	-0.18	-0.02	0.16	-0.45	-0.58	1.25
PC	-0.54	-0.23	0.03	-0.05	0.03	0.18	-0.98	0.72
GE	-0.48	-0.45	0.15	-0.01	-0.35	-0.22	0.85	-0.61
Correlação canônica	0.89	0.77	0.53	0.23	0.92	0.72	0.41	0.32
Graus de liberdade	28	18	10	4	28	18	10	4
p-valor	0.08	0.48	0.87	0.94	0.07	0.7	0.94	0.82

DISCUSSÃO

As diferentes respostas das cultivares estão relacionadas à genética que reflete nas características das plantas (tamanho, arquitetura, ramificações e folhas), na capacidade para translocar, absorver e acumular nutrientes, produzir fotoassimilados, resistir a pragas, ou seja, nas alterações fisiológicas, morfológicas e fenológicas das plantas (KOESTER et al., 2016; LIU et al., 2016; TODESCHINI et al., 2019; WHITE; BROADLEY, 2009).

Na cultivar ND 5959 IPRO o grupo de variáveis da planta e da semente apresentou correlação canônica de alta magnitude, onde as variáveis MPA, MMG e PG do grupo I foram determinantes no aumento do vigor das sementes representadas pela menor CE e maior CPA, EA, PC, e da taxa de germinação pela maior GE. Ressaltando a importância do manejo da cultura durante todo o ciclo de cultivo para obtenção de sementes com qualidade física,

fisiológica e sanitária (NETO-FRANÇA et al., 2016). Já dentro do grupo das variáveis da planta, na correlação linear de Pearson foi possível verificar a influência positiva de MPA, MMG e NLP na PG, destacando essas variáveis para obtenção de produtividades maiores, ou seja, devem ser priorizados manejos que influenciem em ganhos nessas. Correlação que também foi verificada para a TMG 7062 (Tabela 1). Para Todeshini et al. (2019) o NLP possui maior influência no aumento de PG. Já Wang et al. (2016) atribui acréscimos na PG pela MMG. Resultados que corroboram com os obtidos no presente estudos onde tivemos as duas variáveis com correlação positiva com a produtividade.

Quanto a MPA podemos inferir que quanto maior, possivelmente maior a atividade fotossintética dessas plantas, resultando em maior capacidade de acúmulo de fotoassimilados que serão utilizados no enchimento de grãos (AINSWORTH et al., 2012; KASCHUK et al., 2010). Além disso, na correlação de Pearson das variáveis fisiológicas da cultivar ND 5959 IPRO, as folhas com maior concentração de proteínas relacionaram-se com grãos de maiores teores de proteínas (Tabela 1). Indicando transporte de assimilados das folhas para os grãos, sendo que a principal forma de fotossintato translocado a sacarose que é fonte de carbono e energia para formação das proteínas e óleos (SMITH et al., 1989). Ademais, a síntese de proteína é dependente da disponibilidade de nitrogênio para a semente influenciando as concentrações de proteína e óleo (PIPOLO; SINCLAIR; CAMARA, 2004). Essa característica dos grãos é importante no que tange a produção de ração animal, além disso, o uso da proteína de soja tem baixo custo, o que tem impulsionado a indústria alimentícia pelo acréscimo da sua utilização também na alimentação humana.

Em relação à quantidade de proteínas nos grãos na cultivar ND 5959 IPRO, não houve correlação canônica significativa, contudo, considerando a alta magnitude da correlação do primeiro par canônico observamos que sementes com maior Protgrão apresentaram maior vigor (Tabela 4). O que segundo Henning et al. (2010) está relacionado a capacidade de mobilização de reservas da semente durante a germinação. Isso ocorre, pois as sementes em sua constituição possuem proteínas de armazenamento, as quais são necessárias como fontes de energia metabólica que auxiliam na construção de tecidos vegetais da nova plântula (GOYAGA et al., 2011; KIM et al., 2011). Corroborando com os resultados obtidos por Carvalho e Nakagawa (2012), onde sementes com maior qualidade fisiológica apresentam maior teor de proteína bruta no grão.

A relação entre vigor e Protgrão também foi evidenciada pela avaliação de CE, pois quanto maior a liberação de lixiviados das sementes em solução, mais desestruturada as membranas e sua seletividade (VIEIRA et al., 2002), em decorrência da baixa disponibilidade

de proteínas e enzimas que realizam a reorganização e formação das estruturas das membranas celulares. Sendo assim, sementes com maior vigor são capazes de originar plântulas mais uniformes e competitivas em termos de espaço e recursos naturais (MÜLLER et al., 2017).

A síntese de proteínas está relacionada principalmente com a capacidade da planta de absorver nutrientes como o nitrogênio, que é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014), sendo necessário em diversos processos do crescimento e desenvolvimento das plantas. Segundo Hikosaka e Terashima, (1995), o nitrogênio é essencial para a síntese da principal enzima de fixação de CO₂, a Rubisco, e também de clorofilas; e é necessário na fixação de nitrogênio podendo aumentar a concentração do nutriente na folha e, portanto, estimular a fotossíntese. O que nos leva a novamente a variável NLP, pois esse nutriente é contribui para a não abscisão das flores e posteriormente dos legumes nas plantas (CÂMARA, 2014). Portanto, merecem destaque os manejos para fornecimento em quantidades suficientes desse nutriente para cultura. Visto que, a transferência de fotoassimilados da fonte (folhas) para o dreno (grãos) é controlada por uma rede de sinalização altamente regulada pela disponibilidade de recursos (ROSSI; BERMUDEZ; CARRARI, 2015). Contudo, a relação fonte-dreno sofre interferência do ambiente, o qual estimula a atividade da fotossintética da fonte e conseqüentemente aumenta a atividade do dreno (crescimento e armazenamento de tecidos) (KORNER, 2015)

Na cultura da soja o aumento na síntese de proteínas depende de manejos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizados por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o qual segundo Zimmer et al. (2016) resulta em maior conteúdo de proteínas nos grãos comparado a aplicação de fertilizante nitrogenado. Ainda segundo KASCHUK et al. (2010), as plantas inoculadas possuem taxas mais elevadas de fotossíntese e atrasam a senescência das folhas, permitindo maior tempo para produção de fotoassimilados. Todavia, para uma melhor eficiência da FBN há necessidade de micronutrientes como o Cobalto e Molibdênio, pois estão envolvidos no processo de transformação do nitrogênio atmosférico em forma assimilável pela planta (MUS et al., 2013). Manejos esses que foram realizados no experimento em estudo.

Dessa forma, os resultados obtidos remetem à necessidade de manejo durante todo o ciclo da cultura com o objetivo de obtenção de plantas com maior concentração de proteína das folhas, assim teremos maior produtividade de grãos e teor de proteína no grão, e no caso de produção de sementes, sementes mais vigorosas e com maiores taxas de germinação.

Ademais, a produção de sementes de qualidade é fundamental, pois sementes mais vigorosas promovem o estabelecimento uniforme e rápido de plântulas na lavoura, proporcionando uma melhor cobertura do solo e sistema radicular mais profundo, obtendo-se vantagens pelo melhor aproveitamento de água, luz, nutrientes e início antecipado do processo fotossintético e da fixação biológica de N pelas plantas (CANTARELLI et al., 2015; CAVERZAN et al., 2018; FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; HENNIG, 2012; MÜLLER et al., 2017). Melhor cobertura do solo, pela taxa de crescimento mais rápida, também proporcionando o sombreamento antecipado da superfície do solo reduzindo a evaporação de água do solo e permitindo que seja utilizada no crescimento das plantas. Outra vantagem da cobertura é o controle de plantas daninhas pela falta de luminosidade para que essas germinem, evitando competição com as plantas cultivadas. Além disso, quando as sementes são menos vigorosas dão origem a lavouras mais desuniformes e com estande reduzido (VANZOLINI; CARVALHO, 2002), refletindo em plantas dominadas e dominantes que contribuirão para uma PG reduzida.

Nesse contexto, a cultivar ND 5959 apresenta duas características que aliadas são de grande importância no quesito do melhoramento vegetal dessa planta vista ao eminente crescimento populacional, que são teor de proteína no grão e produtividade de grãos. Todavia, destaca-se a necessidade de mais estudos de análise das correlações canônicas nos diferentes genótipos da cultura da soja, vista as diferentes respostas apresentadas nesse estudo, assim selecionando os principais grupos de variáveis para estudos de seleção de genótipos dessa cultura.

CONCLUSÃO

A correlação entre os grupos depende da cultivar utilizada.

Sementes da cultivar ND 5959 IPRO com menor condutividade elétrica e maior comprimento de parte aérea, envelhecimento acelerado, primeira contagem e germinação (variáveis do grupo da semente) são determinantes no aumento da massa seca de parte aérea, massa de mil grãos e produtividade de grãos (variáveis do grupo da planta).

Plantas da cultivar ND 5959 IPRO com maior massa de mil grãos e produtividade de grãos (variáveis da planta) são determinantes no aumento da proteína dos grãos e folhas (variáveis fisiológicos).

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E. A. et al. Accelerating yield potential in soybean: potential targets for biotechnological improvement. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 1, p. 38-52, 2012.
- ALVAREZ, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BORCHERS, H. W. **Pracma: practical numerical math functions**, 2018.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. In: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, MAPA/ACS. 2009. 395p.
- BUTTS, C. T. **Yacca: Yet Another Canonical Correlation Analysis Package**, 2018.
- CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, v. 147, p. 1- 9, 2014.
- CANTARELLI, L. D. et al. Variability of soybean plants originated from seeds with different levels of physiological quality. **Acta Agronômica**, v. 64, n. 3, p. 234-238, 2015.
- CARGNIN, A. Canonical correlations among grapevine agronomic and processing characteristics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.
- CARVALHO, I. R. et al. Canonical correlations between morphological traits and yield components in dual-purpose wheat. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 690-697, 2015.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 588p
- CAVERZAN, A. et al. How Does Seed Vigor Affect Soybean Yield components?. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1318-1327, 2018.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, 4 ed. Editora UFV: Viçosa, 2012.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, 2013. 353p.
- FARAWAY, J. **faraway: Functions and Datasets for Books by Julian Faraway**, 2016. Disponível em: <<https://CRAN>>.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of Soybean Development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p.
- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Plantas de alto desempenho e a produtividade da soja. **Seed News**, v.16, n.6, p.8-11, 2012.

GABRIEL, M. et al. Chemical control of Asian soybean rust and its effect in the yield and quality of soybean seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 10, 2018.

GOYOAGA, C. et al. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 391-397, 2011.

HENNING, F. A. et al. Chemical composition and reserve mobilization in soybean seeds with high and low vigor. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 727-733, 2010.

HIKOSAKA, K.; TERASHIMA, I. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. **Plant, Cell & Environment**, v. 18, n. 6, p. 605-618, 1995.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HUNGRIA, M. et al. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, Dordrecht, 2005. p. 25-42.

KASCHUK, G. et al. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-69, 2010.

KIM, H. T. et al. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 9, p. 1178-1187, 2011.

KNEBEL, D. F. et al. Economic efficiency and soybean yield due to the use of different fungicide combinations. **Plant Omics**, v. 12, n. 1, p. 9, 2019.

KOESTER, R. P. et al. Has photosynthetic capacity increased with 80 years of soybean breeding? An examination of historical soybean cultivars. **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 5, p. 1058-1067, 2016.

KÖRNER, C. Paradigm shift in plant growth control. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 107-114, 2015.

LA MENZA, N. C. et al. Is soybean yield limited by nitrogen supply?. **Field Crops Research**, v. 213, p. 204-212, 2017.

LENG, G. et al. The role of climate covariability on crop yields in the conterminous United States. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.

MACHOLDT, J.; HONERMEIER, B. Impact of highly varying seeding densities on grain yield and yield stability of winter rye cultivars under the influence of delayed sowing under

sandy soil conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, n. 14, p. 1977-1992, 2017.

MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 421-426, 2001.

MEDIC, J; ATKINSON, C; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 91, n. 3, p. 363-384, 2014.

MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: J. Wiley, 1982. 504p.

MUS, F. et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.

MÜLLER, M. et al. Grain yield differences of soybean cultivars due to solar radiation interception. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 11, p. 2795, 2017.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

NAVARRO JÚNIOR, H. M.; COSTA, J. A.. Contribuição relativa dos componentes do rendimento para produção de grãos em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 269-274, 2002.

NETO, FRANCA et al. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2016.

PEREIRA, E. M. et al. Canonical correlations between agronomic traits and seed physiological quality in segregating soybean populations. **Genetics And Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 11, 2017.

PIPOLO, A. E.; SINCLAIR, T. R.; CAMARA, G. M. Protein and oil concentration of soybean seed cultured in vitro using nutrient solutions of differing glutamine concentration. **Annals of applied biology**, v. 144, n. 2, p. 223-227, 2004.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2019.

RAO, N. K.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. **Genetic resources and crop evolution**, v. 64, n. 5, p. 1061-1074, 2017.

REDDY, K. R. et al. Ultraviolet-B radiation alters soybean growth and seed quality. **Food and Nutrition Sciences**, v. 7, n. 01, p. 55, 2016.

RIEDEL, W. E.; OSBORNE, S.; PIKUL, J. L. Soil attributes, soybean mineral nutrition, and yield in diverse crop rotations under no-till conditions. **Agronomy Journal**, v. 105, n. 4, p. 1231-1236, 2013.

ROSSI, M.; BERMUDEZ, L.; CARRARI, F.. Crop yield: challenges from a metabolic perspective. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 79-89, 2015.

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

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3rd ed. New York: McGraw Hill Book, 1997. 666p.

TODESCHINI, M. H. et al. Soybean genetic progress in South Brazil: physiological, phenological and agronomic traits. **Euphytica**, v. 215, n. 7, p. 124, 2019.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics: World Population Prospects 2019, 2019. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

USDA. World Agricultural Production: Brazil Soybeans: Brazil Expected to be World's Leading Soybean Producer Despite Planting Delays Caused by Drought. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

VANZOLINI, S.; CARVALHO, N. M. Effects of soybean seed vigor on field plant performance. **Journal of Seed Science**, v. 24, n. 3, p. 33-41, 2002.

VIEIRA, R. D. et al. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, 2002.

WANG, C. et al. Seventy-five years of improvement of yield and agronomic traits of soybean cultivars released in the Yellow-Huai-Hai River Valley. **Crop Science**, v. 56, n. 5, p. 2354-2364, 2016.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

WIJEWARDANA, C.; REDDY, K. R.; BELLALLOUI, N. Soybean Seed Physiology, Quality, and Chemical Composition under Soil Moisture Stress. **Food Chemistry**, v. 278, p. 92-100, 2019.

ZANON, A. J.; STRECK, N. A.; GRASSINI, P. Climate and management factors influence soybean yield potential in a subtropical environment. **Agronomy Journal**, v. 108, n. 4, p. 1447-1454, 2016.

ZIMMER, S. et al. Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. **European Journal of Agronomy**, v. 72, p. 38-46, 2016.

6 DISCUSSÃO

O constante crescimento populacional tem colocado o cultivo da soja como uma das principais alternativas para suprir a alimentação humana nas próximas décadas. Nesse estudo, focou-se na nutrição da planta com nitrogênio (N) por meio de bactérias fixadoras de N, na busca por respostas de tecnologias que permitem melhorar o processo de fixação biológica, visto que a resposta em plantas ao nutriente é significativa e o método é financeiramente de baixo custo e sustentável ambientalmente.

No estudo observou-se a importância da co-inoculação anual (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*), que garantiu a persistência de cepas de elite das bactérias no solo, as quais proporcionaram maior eficiência no processo de FBN e repercutiram no aumento da produtividade, do teor de proteína nos grãos e na manutenção da qualidade de sementes da próxima geração. Assim, ficam evidentes as contribuições da co-inoculação no crescimento e desenvolvimento em todo o ciclo de cultivo da planta.

Nesse sentido, vale ressaltar a priorização de sementes de boa qualidade, uma vez que a contribuição para o desenvolvimento inicial das plântulas provém das reservas da semente, importante no estabelecimento de estantes de plântulas uniformes com maior capacidade competitiva, bem como originar grãos e sementes com melhor qualidade e proporcionar maior produtividade de grãos. Também foi possível maior clareza quanto à aplicação de Co e Mo no tratamento de semente, a qual não foi prejudicial à sobrevivência de bactérias inoculadas refletindo em ganhos de produtividade de grãos e na qualidade de sementes e grãos.

Dentro do capítulo I foi realizada uma análise quanto ao custo pela utilização das tecnologias, onde observamos o retorno econômico elevado pelas tecnologias de Co-inoculação + Co e Mo no TS, com média de R\$ 929,00 ha⁻¹ para a cultivar ND 5959 IPRO e de R\$ 404,00 ha⁻¹ para TMG 7062 em relação testemunha (aplicação somente de fungicida e inseticida), comprovando a eficiência desses e as vantagens pelo baixo custo e alto retorno financeiro. Os resultados também apontam a obtenção de lucro ao produtor quando Co e Mo são aplicados foliar, o que deixa o produtor com essa alternativa caso não possa realizá-la no tratamento de sementes.

Já a osmoproteção, sob condições obtidas no experimento de campo, não se mostrou eficiente na sobrevivência de bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente quando associada à aplicação de cobalto e molibdênio resultando em menores produtividades de grãos. Portanto, são necessários estudos quanto à aplicação de produtos no procedimento de

inoculação, visto seus efeitos na população bacteriana e na planta, de modo a evitar gastos desnecessários, pois os custos de produção estão cada vez maiores e a quantidade de produtos novos no mercado aumentando.

Também foram observadas respostas distintas nas cultivares avaliadas, limitando as recomendações devido ao elevado número de cultivares de soja disponíveis no mercado com características distintas entre si. Portanto, enfatiza-se a necessidade de mais estudos com intuito de obter maior eficiência do processo de inoculação e co-inoculação nas diferentes cultivares para que haja otimização dos patamares produtivos e maior sustentabilidade do sistema.

7 CONCLUSÃO

A co-inoculação associada à aplicação de Co e Mo é uma tecnologia que contribui para o aumento na produtividade de grãos, na qualidade de sementes da próxima geração e no teor de proteínas do grão da cultura da soja com custo de produção relativamente baixo.

A análise de correlações canônicas mostra que os grupos de variáveis da planta, das sementes e fisiológicos não são independentes, definindo as características que devem ser priorizadas nas avaliações, sendo dependentes da cultivar avaliada.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; DA SILVA, I. F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012.
- ARAÚJO, R. S. et al. Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: Technological innovation for large-scale agriculture. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1-11, 2017.
- BÁRBARO, I. M. et al. Produtividade da soja em resposta á inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, v. 5, n. 1, p.1-7, 2009.
- BURK, D.; BUMS, R. H. Biochemical nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 587-618, 1941.
- CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agronômicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: v. 7 - safra 2019/20- n. 4 quarto levantamento, janeiro 2020**. Brasília, Brasil: CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 6 fev. 2020.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. Contribution of nitrogen derived from mineral supplementation for soybean seedlings. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 1, p. 33-41, 2018.
- DA SILVA, K. et al. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* pre-inoculation in association with chemical treatment of soybean seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 14, p. 726-732, 2018.
- DEAK, E. A. et al. Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1327, 2019.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 573-580, 2007.
- DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host development pathways. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 348-358, 2011.
- DOURADO NETO, D. et al. Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 2741-2752, 2012.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer, 2005. 380 p.
- FAROOQ, M. et al. Micronutrients application through seed treatments: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 125-142, 2012.

FERRI, G. C. et al. Effects of associated co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilense* on soybean yield and growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 6-11, 2017.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.

GALINDO, F. S. et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, n. 1, p. 1-18, 2016.

GROPPIA, M. D.; ZAWOZINIK, M. S.; TOMARO, M. L. Effect of coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. **European Journal Soil Biology**, v. 34, n. 2, p. 75-80, 1998.

GUERRA, C. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de soja em função da adubação com fósforo, molibdênio e cobalto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 91-97, 2008.

HARTLEY, E. J.; GEMELL, L. G.; DEAKER, R. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed. **Crop and Pasture Science**, v. 63, n. 9, p. 858-865, 2013.

HILLE, R. The molybdenum oxotransferases and related enzymes. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 9, p. 3029-3042, 2013.

HUNGRIA, M. et al. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, Dordrecht, 2005. p. 25-42.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.) **Biological Nitrogen Fixation**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. cap. 99, p.1009-1023. DOI: 10.1002/9781119053095.ch99.

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.

INDRASUMUNAR, A.; DART, P. J.; MENZIES, N. W. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil stress factors in acidic agar media. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2046-2050, 2011.

JOHANSEN, C. et al. Correcting molybdenum deficiency of chickpea in the high barind tract of Bangladesh. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 6, p. 752-761, 2006.

JUGE, C. et al. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 147-157, 2012.

LOPES, M. E. B. M.; LEONEL JÚNIOR, F. L. Efeito da aplicação de fungicidas, cobalto e molibdênio em sementes de soja sobre a sanidade, emergência e produtividade da cultura. **Revista de Agricultura**, v. 75, p. 87-86, 2000.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 674 p.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849 p.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2006. 726 p.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. O. et al. Soja. In: PROCHNOW, L. I. et al. (Ed.). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes**. Piracicaba: IPNI, 2010. v. 3, p. 5-42.

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.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 407 p.

REICHENBACH, J. Film-coating para agregar qualidade e segurança. **Seed News**, n. 1, p. 24-25, 2004.

SALVADORI, J. R. et al. Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2016/2017 e 2017/2018. **REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL**, v. 41, p. 113-120, 2016.

SHINDE, P. et al. Standardization of seed coating polymer in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 28, n. 3, p. 412-413, 2015

SILVA, A. F. et al. Inoculação com *Bradyrhizobium* e formas de aplicação de cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 98- 104, 2011.

SILVA, M. S. et al. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

STECCA, J. D. L. et al. Inoculation of soybean seeds coated with osmoprotector in diferents soil pH's. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**.6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TIEN, T. M.; GASKIN, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum*

americanum L.) **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics: World Population Prospects 2019, 2019. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

USDA. World Agricultural Production: Brazil Soybeans: Brazil Expected to be World's Leading Soybean Producer Despite Planting Delays Caused by Drought. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

WESSMAN, P. et al. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 14, p. 2518-2528, 2011.