

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

Evandro Ademir Deak

**ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO NA CULTURA DA
SOJA: PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE GRÃOS**

Santa Maria, RS

2020

Evandro Ademir Deak

**ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA:
PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE GRÃOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do 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 grau de **Doutor em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

Santa Maria, RS
2020

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

Deak, Evandro Ademir

Adubação com enxofre e coinoculação na cultura da soja:
Produtividade e qualidade de grãos / Evandro Ademir
Deak.- 2020.

91 p.; 30 cm

Orientador: Thomas Newton Martin

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2020

1. Enxofre Elementar 2. Fixação Biológica de Nitrogênio
3. Nutrição de Plantas 4. Proteína 5. Qualidade de
Sementes I. Martin, Thomas Newton II. 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, EVANDRO ADEMIR DEAK, 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.

Evandro Ademir Deak

**ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA:
PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE GRÃOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do 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 grau de **Doutor em Agronomia**.

Aprovado em 07 de agosto de 2020:



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



Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr. (UFSM) – Videoconferência



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM) – Videoconferência



Gerusa Massuquini Conceição, Dra. (UNIJUI) – Videoconferência



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

Santa Maria, RS
2020

DEDICO

Dedico este trabalho aos meus pais Elaine Ladi Deak e Fredolino Deak (in memorian), e ao meu irmão Ivanir André Deak (in memorian), seus ensinamentos foram fundamentais para a minha formação profissional. À minha noiva Carla Fernanda Lorentz, pelo apoio e companheirismo durante o período de estudos. Dedico a vocês esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus por sempre estar no comando de minhas decisões, e que seja feita a sua vontade sempre.

À Universidade Federal de Santa Maria, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador professor Dr. Thomas Newton Martin, pelo companheirismo e dedicação na orientação durante os cinco anos de pós-graduação.

Aos colegas de pós-graduação do Grupo Coxilha: Giovane Burg, Mateus Martins, Dionatas Rodrigues, Jessica Stecca, Rosana Vey, Fernando Sintra, Joanei Cechin, pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos alunos de iniciação científica por toda a ajuda na condução dos experimentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, pela disponibilidade da área de pesquisa para a condução de parte dos experimentos.

Aos membros do comitê de orientação Thomas Newton Martin, Luciane Almeri Tabaldi e Ivan Francisco Dressler da Costa, pelo auxílio durante o planejamento e condução dos experimentos.

Aos professores que fizeram parte da banca examinadora: Thomas Newton Martin, Luciane Almeri Tabaldi, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Gerusa Massuquini Conceição e Francisco Javier López Baena.

À todas as pessoas que participaram da minha formação, familiares, amigos, professores.

Muito obrigado!

RESUMO

ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO NA CULTURA DA SOJA: PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE GRÃOS

AUTOR: Evandro Ademir Deak
ORIENTADOR: Thomas Newton Martin

O equilíbrio nutricional do solo é um dos principais fatores que afetam a produtividade de grãos das culturas, sendo essencial que os nutrientes estejam disponíveis no solo em níveis acima do limite crítico estabelecido para cada grupo de culturas. O nutriente de maior demanda pela cultura da soja é o nitrogênio (N). No Brasil a soja obtém este nutriente principalmente por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por bactérias diazotróficas, que convertem o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃⁺). Este processo biológico é dependente de condições favoráveis do ambiente de cultivo, destacando-se a disponibilidade de enxofre (S), um dos nutrientes essenciais ao metabolismo dos bacterióides. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito da inoculação e da coinoculação, combinadas com doses de S, sobre a produtividade e qualidade de grãos, bem como sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. Para isso, foram conduzidos experimentos a campo e no laboratório de sementes. Foram conduzidos quatro experimentos a campo durante as safras agrícolas 2017/2018 e 2018/2019, sendo dois em Santa Maria e dois em Augusto Pestana, Rio Grande do Sul, Brasil. Utilizou-se a cultivar Nidera 5959 IPRO. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, e os tratamentos foram distribuídos em um fatorial 3 x 4, combinando três tipos de inoculação [Testemunha (não inoculado), Inoculação com *Bradyrhizobium* spp., e Coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. + *Azospirillum brasilense*] com quatro doses de S (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), fornecido via S-elementar (90 % de S). Nos experimentos conduzidos a campo (Artigo 1) foi avaliada a nodulação de plantas, os componentes da produtividade, a produtividade e a qualidade de grãos. Com as sementes colhidas dos experimentos de campo da safra 2017/2018 foram conduzidos dois experimentos no laboratório de sementes (Artigo 2), nestes foi avaliada a qualidade fisiológica de sementes e atividade enzimática de plântulas. Os principais resultados obtidos foram que o S-elementar é uma alternativa eficiente para disponibilizar sulfato às plantas, promovendo maior nodulação, acúmulo de massa seca de plantas, produtividade e qualidade dos grãos de soja. Além disso, a adubação com S-elementar combinada com a coinoculação de plantas genitoras possibilita a expressão do vigor de suas sementes, além de promover a obtenção de sementes com maior percentual de germinação, possivelmente devido a maior nodulação e consequentemente acúmulo de N. Conclui-se que a adubação com S-elementar combinada com a coinoculação promove aumento na qualidade de grãos e sementes de soja.

Palavras-chave: Enxofre Elementar. Fixação Biológica de Nitrogênio. Nutrição de Plantas. Proteína. Qualidade de Sementes.

ABSTRACT

SULFUR FERTILIZATION AND CO-INOCULATION IN SOYBEAN CULTURE: GRAIN PRODUCTIVITY AND QUALITY

AUTHOR: Evandro Ademir Deak
ADVISER: Thomas Newton Martin

The nutritional balance of the soil is one of the main factors that affect the grain yield of crops, and it is essential that nutrients are available in the soil at levels above the critical limit established for each group of crops. The nutrient of greatest demand for soybean culture is nitrogen (N). In Brazil soybeans obtain this nutrient mainly through biological nitrogen fixation (FBN), carried out by diazotrophic bacteria, which convert atmospheric nitrogen (N₂) into ammonia (NH₃⁺). This biological process is dependent on favorable conditions in the cultivation environment, highlighting the availability of sulfur (S), one of the essential nutrients for the metabolism of bacterioids. The objective of this research was to evaluate the effect of inoculation and co-inoculation, combined with doses of S, on the productivity and quality of grains, as well as on the physiological quality of soybean seeds. For this, experiments were conducted in the field and in the seed laboratory. Four field experiments were carried out during the 2017/2018 and 2018/2019 crops, two in Santa Maria and two in Augusto Pestana, Rio Grande do Sul, Brazil. The cultivar Nidera 5959 IPRO was used. The experimental design was randomized blocks, and the treatments were distributed in a 3 x 4 factorial, combining three types of inoculation [Control (non-inoculated), inoculation with *Bradyrhizobium* spp., and co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. + *Azospirillum brasilense*] with four doses of S (0, 20, 40 and 60 kg ha⁻¹), supplied via elemental-S (90 % S). In experiments conducted in the field (Article 1), the nodulation of plants, yield components, productivity and grain quality were evaluated. With the seeds harvested from the field experiments of the 2017/2018 crop, two experiments were conducted in the seed laboratory (Article 2), in which the physiological quality of seeds and enzymatic activity of seedlings were evaluated. The main results obtained were that elemental-S is an efficient alternative to make sulfate available to plants, promoting greater nodulation, accumulation of dry mass of plants, productivity and quality of soybeans. In addition, fertilization with elemental-S combined with co-inoculation of parent plants allows the expression of the vigor of its seeds, in addition to promoting the obtaining of seeds with a higher percentage of germination, possibly due to greater nodulation and consequently accumulation of N. Concludes it is believed that fertilization with elemental-S combined with co-inoculation promotes an increase in the quality of soybeans and seeds.

Key words: Elemental sulfur. Biological Nitrogen Fixation. Seed Quality. Protein. Plant Nutrition.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Caracterização química do solo das áreas experimentais de Santa Maria e Augusto Pestana antes da instalação dos experimentos. Safras 2017/2018 e 2018/2019.	25
Tabela 2 – Teor de sulfato no solo ao longo do ciclo de cultivo, para Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 e 2018/2019.	30
Tabela 3 – Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para os experimentos de Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 e 2018/2019.	32
Tabela 4 – Matriz da correlação de Pearson para variáveis mensuradas após a aplicação de tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha ⁻¹). Santa Maria (valores acima da diagonal principal) e Augusto Pestana (valores abaixo da diagonal principal). Safras 2017/2018 e 2018/2019.	41

ARTIGO 2

Tabela 1 – Caracterização química do solo das áreas experimentais de Santa Maria (Exp 1) e Augusto Pestana (Exp 2) antes da instalação dos experimentos. Safra 2017/2018.	56
Tabela 2 – Caracterização dos lotes de sementes obtidos do campo. Santa Maria e Augusto Pestana, RS. Safra 2017/2018.	59
Tabela 3 – Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para os experimentos com sementes de Santa Maria (Exp 1) e Augusto Pestana (Exp 2).	63
Tabela 4 – Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para as variáveis fisiológicas com plântulas do experimento de Santa Maria (Exp 1).	68

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 – Precipitação pluvial e temperatura média em Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 (A) e 2018/2019 (B). 24
- Figura 2 – Número de nódulos (A e B), massa seca de nódulos (C), massa seca de planta (D), número de vagens por planta (E), produtividade de grãos (F), teor de proteína bruta (G), e teor de óleo (H), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Santa Maria (2017/2018). 36
- Figura 3 – Número de nódulos (A), massa seca de nódulos (B), número de vagens por planta (C), produtividade de grãos (D), teor de proteína bruta (E), e teor de óleo (F) em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Augusto Pestana (2017/2018). 37
- Figura 4 – Número de nódulos (A e B), número de vagens por planta (C), teor de óleo (D), e proteína bruta (E e F), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Santa Maria (2018/2019). 38
- Figura 5 – Número de nódulos (A), massa seca de nódulos (B), massa seca de planta (C), teor de proteína bruta (D), e teor de óleo (E), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Augusto Pestana (2018/2019). 39
- Figura 6 – Produtividade relativa (A), eficiência agrônômica (B), e viabilidade econômica (C) da comercialização de grãos de soja, em função da aplicação de doses de enxofre (20, 40 e 60 kg ha⁻¹), tendo como referência a dose zero. Santa Maria e Augusto Pestana, safras 2017/2018 e 2018/2019. 46

ARTIGO 2

- Figura 1 – Resultados dos testes de primeira contagem (A e B), germinação (C), comprimento de parte aérea (D), condutividade elétrica (E), e de envelhecimento acelerado (F), de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), para o Exp 1. 78
- Figura 2 – Resultados dos testes de primeira contagem (A), comprimento de parte aérea (B), comprimento de raiz (C) e de envelhecimento acelerado (D), de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹) para o Exp 2. 79

- Figura 3 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio na parte aérea (A) e raízes (B), atividade da enzima guaiacol peroxidase na parte aérea (C) e raízes (D), e atividade da enzima superóxido dismutase na parte aérea (E) e raízes (F) de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), para o Exp. 1..... 80
- Figura 4 – Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹) para o Exp. 1. 81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivos específicos	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	14
2.2	COINOCULAÇÃO	17
2.3	ENXOFRE (S)	18
3	ARTIGO 1 - ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO COM <i>Bradyrhizobium</i> E <i>Azospirillum</i> PODE MELHORAR A PRODUTIVIDADE E A QUALIDADE DE GRÃOS DE SOJA	21
4	ARTIGO 2 – INCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO ASSOCIADAS AO USO DE ENXOFRE AUMENTAM A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E REDUZEM O ESTRESSE OXIDATIVO EM PLÂNTULAS DE SOJA	52
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a cultura de maior expressão em área cultivada no Brasil, ocupando 36,84 milhões de hectares na safra 2019/2020, com produção de 122,06 milhões de toneladas, e produtividade média de 3,31 toneladas por hectare (CONAB, 2020). O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais do grão, e o cultivo de soja no país está entre as atividades de maior expansão econômica das últimas décadas. Isso deve-se principalmente ao interesse mundial no grão de soja como fonte de proteína e óleo, e também pela geração de tecnologias e adoção de práticas de manejo que permitiram a expansão e adaptação da cultura no país (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Diante da importância econômica da soja, um dos principais aspectos a ser considerado no manejo da cultura é a utilização de sementes com qualidade genética, física, sanitária e fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Sementes de qualidade possibilitam o estabelecimento rápido e uniforme das plantas no campo, formando o primeiro componente da produtividade. Outro aspecto a ser considerado é a nutrição de plantas, que tem por objetivo suprir as demandas nutricionais da cultura durante o ciclo de cultivo. Neste contexto, o nutriente que estiver em menor disponibilidade, será o fator limitante da produtividade, mesmo com o adequado suprimento dos demais fatores (MALAVOLTA, 2006).

O nutriente de maior demanda pela soja é o nitrogênio (N), e para a soja cultivada no Brasil este é proveniente principalmente da fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo que beneficiou o aumento na produtividade e na lucratividade da cultura no país (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Na soja a FBN é realizada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp., as quais realizam simbiose com as plantas, captando o nitrogênio atmosférico (N₂) convertendo este em amônia (NH₃⁺), tornando-o disponível às plantas (REIS; TEIXEIRA, 2005). Além das bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, a associação destas com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* vem mostrando resultados positivos na nodulação, no comprimento de raízes e na produtividade de grãos de soja. *Azospirillum brasilense* são bactérias pertencentes a um grupo conhecido como bactérias promotoras do

crescimento de plantas (BPCP), devido a sua capacidade de estimular o crescimento vegetal, por meio da indução na produção de hormônios vegetais (RODRIGUES et al., 2015).

Todos os nutrientes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e também à FBN. Neste contexto, o enxofre (S) é um nutriente que vem apresentando relatos de deficiência nos solos pelo mundo, implicando em limitações na produtividade das culturas (ALVAREZ, 2004). Isso deve-se principalmente ao aumento na exportação do nutriente pela utilização de cultivares com elevado potencial produtivo, bem como pela utilização de formulações de fertilizantes com baixas concentrações de S, aliado a elevada mobilidade deste elemento no solo quando na forma de sulfato.

A deficiência de S pode causar redução na FBN, pois este nutriente é um constituinte importante da ferredoxina, enzima responsável pelo transporte de elétrons até as subunidades da nitrogenase, que é a enzima responsável pela quebra do N₂ nos nódulos (UDVARDI et al., 2013). Além disso, o S participa da formação de proteínas, e como a soja apresenta elevado teor de proteína nos grãos, a baixa disponibilidade deste nutriente causa redução na qualidade e na quantidade de proteínas formadas, devido a limitação deste na formação de aminoácidos essenciais (KRISHNAN; JEZ, 2018). Isso resulta em aumento nos custos de produção dos subprodutos obtidos a partir da moagem da soja. O farelo de soja é amplamente utilizado na formulação de rações, servindo como a principal fonte de proteína, e quando os grãos de soja apresentam baixo percentual proteico, é necessário aumentar a proporção de farelo na composição final da ração (HIRAKURI et al., 2018).

Além da influência sobre a qualidade de grãos, a disponibilidade de S também pode interferir na qualidade de sementes. A alteração na disponibilidade de um nutriente pode alterar a relação entre a absorção e acúmulo de outros, conforme mencionado, o S afeta a FBN, e com isso interfere no acúmulo de N e conseqüentemente na formação de proteína, que é uma fonte de reserva utilizada no processo de germinação das sementes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inoculação e da coinoculação, combinadas com doses de enxofre, sobre a produtividade e qualidade de grãos, bem como sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja.

1.1.2 Objetivos específicos

Verificar se a inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e a coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* combinadas com doses de enxofre aumentam a nodulação das plantas, a produtividade e a qualidade dos grãos de soja.

Avaliar se a inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e a coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* combinadas com doses de enxofre influenciam na qualidade fisiológica de sementes de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A proteína e o óleo são os principais componentes de reserva dos grãos de soja, que possuem em média 36 % de proteína e 18 % de óleo (MAHMOUD et al., 2006). Estes componentes são determinantes para o grande interesse comercial pelo grão, que é a principal fonte proteica utilizada na alimentação animal (PIPOLO et al., 2015). Nas últimas décadas tem-se observado aumento na produtividade média de grãos, e redução no teor de proteína (MAHMOUD et al., 2006), atribuindo-se isto principalmente a correlação negativa entre produtividade e teor de proteína (KRISHNAN; JEZ, 2018). O teor de proteína nos grãos é influenciado pela base genética, pelo ambiente de cultivo, e também pela disponibilidade de nutrientes (PIPOLO; SINCLAIR; CÂMARA, 2004).

Neste contexto, a disponibilidade de N influencia na formação de proteínas, pois este nutriente participa diretamente da sua formação, e por isso é o nutriente exigido em maior quantidade pela soja, com uma demanda aproximada de 80 kg por tonelada de grãos produzidos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Na cultura da soja o N pode ser proveniente de diversas fontes, sendo a decomposição da matéria orgânica do solo (MO), a fixação não biológica, os fertilizantes nitrogenados, e a FBN (HUNGRIA et al., 2007). Considerando a produtividade média de 3,31 toneladas de grãos de soja por hectare da safra brasileira 2019/2020 (CONAB, 2020), e a necessidade de N pela cultura da soja, seriam necessários 265 kg de N por hectare para atender a demanda da cultura. Estimando que a eficiência dos fertilizantes nitrogenados é de apenas 50 %, seria necessário fornecer aproximadamente 1200 kg de ureia por hectare, tornando a cultura pouco atraente do ponto de vista econômico ao produtor (ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010).

Contudo, no Brasil, o fornecimento de N para a cultura da soja ocorre principalmente por meio da FBN (SALVAGIOTTI et al., 2008), realizada por meio de bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* spp. em simbiose com as plantas de soja, que podem fornecer até 94 % do N requerido pela cultura (HUNGRIA et al., 2006), dispensando o uso de fertilizantes

nitrogenados, reduzindo os custos de produção e os danos ambientais (ARAUJO et al., 2017). Na FBN o nitrogênio atmosférico (N_2) que compõe aproximadamente 78 % do ar atmosférico e está quimicamente inerte, é convertido em amônia (NH_3), tornando-se disponível às plantas (REIS; TEIXEIRA, 2005). Este processo ocorre por meio do complexo enzimático nitrogenase presente nas bactérias diazotróficas. Em troca, as bactérias recebem das plantas os carboidratos necessários à sua sobrevivência (TAIZ et al., 2017).

Desde a intensificação do cultivo da soja no Brasil, o melhoramento genético foi incentivado a levar em consideração a afinidade de novas cultivares com bactérias diazotróficas, visto que a FBN dispensa o uso de fertilizantes nitrogenados, aumentando a competitividade do grão no mercado externo (HUNGRIA et al., 2007; PRANDO et al., 2019). Além de possibilitar elevados tetos produtivos desde que sejam seguidas as boas práticas de inoculação (HUNGRIA et al., 2006). Neste sentido, juntamente com o melhoramento de plantas, intensivos estudos foram direcionados à seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) com capacidade de suprir a demanda de cultivares mais produtivas.

Deste modo, para que a FBN seja eficiente e possa atender a demanda de N pela cultura, é necessário que seja realizado o processo de inoculação, visando inocular estirpes de bactérias selecionadas pela pesquisa para as condições brasileiras (HUNGRIA et al., 2007; HUNGRIA et al., 2017). No Brasil existem três espécies registradas para a inoculação na cultura da soja, sendo *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079), *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080) (BRASIL, 2011). Assim, objetiva-se com a inoculação colocar as BFN próximas das sementes, afim de permitir a infecção do sistema radicular, favorecendo a competição destas com bactérias nativas ou naturalizadas que são menos eficientes em fixar N_2 (COSTA et al., 2011; LÓPEZ GARCIA et al., 2009; MELCHIORRE et al., 2011).

Durante a germinação e emissão das primeiras raízes, a plântula passa a liberar flavonóides e betaínas no solo, que servem como atrativos químicos ativando genes de nodulação nas bactérias, que passam a se locomover em direção das raízes (ALEXANDRE, 2010; BRENCIC et al., 2005). Após esta troca de sinais, ocorre o contato e a adesão das

bactérias nos pêlos radiculares, causando a deformação e enrolamento dos mesmos. Posteriormente ocorre a degradação da parede celular, permitindo o contato das bactérias com o exterior da membrana plasmática, que será o local onde será exposto o canal de infecção formado pela fusão das vesículas do complexo de golgi. Por este canal as bactérias entram no córtex celular, causando diferenciação celular nesta região, dando início ao processo de formação do primórdio nodular (TAIZ et al, 2017). As bactérias passam a se multiplicar, e as membranas das células do hospedeiro aumentam de volume, formando o nódulo. Após este período de divisão as bactérias se diferenciam em bacterióides, iniciando a FBN (PRADO, 2008; TAIZ et al, 2017).

O nódulo desenvolve um sistema vascular próprio que permite a troca de N fixado por sacarose que a planta irá fornecer para o metabolismo dos bacterióides (BECANA et al., 2018). O N_2 que se difunde pelo espaço poroso do solo, é então aproveitado pelos rizóbios, que quebram a ligação entre os átomos de N_2 . A quebra é realizada por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase, convertendo o N_2 em NH_3 , que pode então ser utilizado no metabolismo da planta. Este preferencialmente é convertido em formas orgânicas (amidas e ureídeos), e então transportado para a parte aérea da planta via xilema (ALBINO; CAMPO, 2001; TAIZ et al, 2017).

O complexo enzima nitrogenase divide-se em dois componentes, a Fe-proteína (4 átomos de ferro e 4 átomos de enxofre) e a MoFe-proteína (40 átomos de ferro e 2 átomos de molibdênio), ambas tornam-se inativas na presença de oxigênio. De modo geral, o H^+ produzido no metabolismo oxidativo é transferido ao complexo nitrogenase, porém, os elétrons precisam de um transportador, que neste caso é a ferredoxina, que conduz os elétrons até a Fe-proteína que hidrolisa ATP e então transfere-os até a MoFe-proteína, que irá utiliza-los na quebra das ligações do N_2 (PRADO, 2008; TAIZ et al, 2017).

A FBN demanda energia, a qual é fornecida pela planta na forma de ATP. Os fotossintatos são importantes, pois eles geram força redutora e ATP para a nitrogenase, são o substrato para o crescimento e a manutenção da atividade das bactérias na assimilação de NH_3^+ (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Deste modo, condições ambientais, ou manipulações

que aumentem a disponibilidade de fotossintatos aos nódulos exercem influência sobre a formação, manutenção e atividade dos mesmos (HUNGRIA; VARGAS, 2000).

2.2 COINOCULAÇÃO

A coinoculação na cultura da soja foi um avanço importante no crescimento da agricultura brasileira. Após décadas de pesquisas com bactérias diazotróficas, passou-se a recomendar um novo gênero de bactérias para soja, as bactérias do gênero *Azospirillum* spp. Estas bactérias são recomendadas em associação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, prática conhecida por coinoculação (ZUFFO et al., 2015). Esta prática possui recomendação para a cultura da soja desde o ano de 2014, e há relatos de incremento médio na produtividade que chegam a 8 % em comparação com a inoculação apenas com *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 2013).

Azospirillum brasilense pertencem a um grupo de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) que colonizam a rizosfera (KLOEPPER; SCHROTH, 1978), e seus benefícios foram inicialmente verificados principalmente quando em associação com espécies de gramíneas (BASHAN; DE BASHAN, 2010). As BPCP estimulam a planta a produzir fitormônios de crescimento, dentre eles as auxinas (ASHRAF et al., 2011; TIEN et al., 1979), giberelinas e citocininas (CASSÁN et al., 2009), além de induzir a resistência da planta à doenças (WANG et al., 2009), solubilizar fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004) e fixar N₂ (ASHRAF et al., 2011).

Dentre os benefícios proporcionados por bactérias do gênero *Azospirillum*, o que mais se destaca é a produção de fitormônios de crescimento, que estimulam o crescimento do sistema radicular das plantas (FIBACH-PALDI et al., 2012). Com maior volume de raízes, as plantas exploram maior volume de solo, aumentando a absorção de água e nutrientes, aliviando os efeitos do déficit hídrico (DEAK et al., 2019; SILVA et al., 2019). Deste modo, com a aplicação de *Azospirillum* existe maior área para infecção de *Bradyrhizobium*, promovendo a nodulação precoce (CHIBEBA et al., 2015; FIPKE et al., 2016), aumento na

produtividade de grãos (HUNGRIA et al., 2013), e na qualidade fisiológica de sementes (QUEIROZ REGO et al., 2018).

2.3 ENXOFRE (S)

O S é considerado um macronutriente secundário, pois sua reposição ao solo normalmente é realizada em associação com algum macronutriente primário (CQFS-RS/SC, 2016). Dentre as funções do S na planta, uma das principais é a sua participação no processo de FBN em leguminosas. O S é constituinte dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina, que são essenciais para a síntese e atividade da enzima nitrogenase (KRISHNAN, JEZ, 2018). Além disso, é constituinte de grupos ferro-enxofre da ferredoxina (4Fe-4S), enzima que participa da reação de transferência de elétrons até as subunidades da nitrogenase (BECANA et al., 2018). De modo geral, nódulos com deficiência de S tem menores níveis de leghemoglobina, glicose, ATP e ferredoxina, quando comparado a nódulos supridos adequadamente com S, limitando a FBN e conseqüentemente a produtividade de grãos (VARIN et al., 2010; GETACHEW et al., 2017).

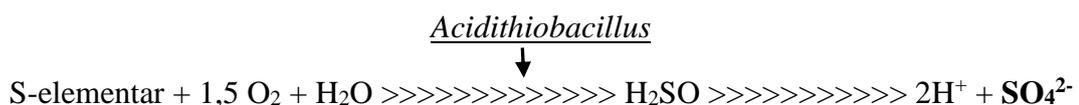
A soja demanda aproximadamente 10 kg de S por tonelada de grãos produzidos (PRADO, 2008). A exigência deste nutriente pela cultura é classificada como média/alta, sendo superior em relação às gramíneas devido ao elevado teor de proteína dos grãos, com demanda similar ou superior ao fósforo (JEMAL et al., 2010). Porém, o manejo inadequado das lavouras, com o uso de fertilizantes mais concentrados em nitrogênio, fósforo e potássio, com baixas ou nulas concentrações de S, vem causando redução nos níveis deste nutriente no solo, principalmente em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica (ALVAREZ, 2004; TIECHER et al., 2017).

De acordo com Comissão de Química e Fertilidade do Solo do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (CQFS-RS/SC, 2016) as culturas estão agrupadas em dois grupos quanto a sua exigência em S, sendo que para as espécies das famílias das fabáceas, brassicáceas e liliáceas o limite crítico no solo é de 10 mg dm⁻³ de sulfato (SO₄⁻²) e de 5 mg dm⁻³ para as demais

espécies. No entanto, devido a restrita atenção dedicada a este nutriente, aproximadamente 50 % dos solos da região norte do estado do Rio Grande do Sul se encontram com o nível de S abaixo do nível crítico para a cultura da soja (TIECHER et al., 2017). Alvarez (2004) também constatou baixos níveis de enxofre nos solos do RS, ao analisar 90 mil amostras, verificou que em 49 % delas o teor de SO_4^{2-} estava abaixo de 10 mg dm^{-3} , e 12,3 % estavam com níveis inferiores à 5 mg dm^{-3} . Nestas áreas possivelmente a FBN esteja limitada para a cultura da soja, conseqüentemente a formação de proteína no grão é prejudicada pela limitação do N. Nestas condições, a possibilidade de resposta à aplicação de S é alta (BROCH et al., 2011).

O S pode ser aplicado ao solo por meio de fertilizantes que possuem o SO_4^{2-} prontamente disponível às plantas como no sulfato de amônio, superfosfato simples, gesso agrícola, sulfato de potássio, ou por meio de fontes que forneçam o S em sua forma elementar. A concentração de S no S-elementar fica em torno 90 %, com isso reduz custos de transporte, armazenamento e de aplicação por unidade de S (HOROWITZ; MEURER, 2006). Porém, o S-elementar não é uma fonte de S prontamente disponível às plantas, visto que estas absorvem este nutriente preferencialmente na forma de sulfato (SO_4^{2-}). Para que o S-elementar possa ser aproveitado pelas plantas este precisa ser oxidado a SO_4^{2-} no solo, passando do seu estado de oxidação S^0 para S^{6+} (MALAVOLTA, 2006). A reação de oxidação de S-elementar a sulfato ocorre em solos bem drenados e com disponibilidade de oxigênio, e os agentes responsáveis por esta oxidação são as bactérias do gênero *Acidithiobacillus* (KELLY, WOOD, 2000).

A reação de oxidação de S-elementar em SO_4^{2-} necessita da disponibilidade de água e oxigênio, conforme pode ser verificado na sua reação no solo (SAIK, 1995);



Esta reação de oxidação gera a formação de ácido sulfúrico (H_2SO) e liberação de íons H^+ no solo, causando redução no pH, que dependendo da intensidade, pode reduzir a taxa de

oxidação por afetar a atividade de *Acidithiobacillus* (HOROWITZ, MEURER, 2006; HOROWITZ, MEURER, 2007; VITTI et al., 2015). Por ser um processo biológico, a oxidação do S-elementar depende de condições do ambiente, dentre temperatura, umidade, aeração, pH, microrganismos, fertilidade do solo. Além destes, fatores relacionados ao modo de aplicação, como tamanho de partícula, distribuição e dose a ser aplicada também influenciam (LUCHETA et al., 2012).

3 ARTIGO 1

ADUBAÇÃO COM ENXOFRE E COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* PODE MELHORAR A PRODUTIVIDADE E A QUALIDADE DE GRÃOS DE SOJA

RESUMO – A inoculação de sementes e o equilíbrio nutricional do solo são fatores decisivos para a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas de soja. O enxofre (S) é um macronutriente indispensável na formação da ferredoxina, enzima doadora de elétrons às sub-unidades da nitrogenase, que realiza a conversão do nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃⁺). Porém, a dinâmica do S no solo é complexa, e isso pode resultar em limitações da disponibilidade do mesmo às plantas. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a relação da adubação com enxofre com a inoculação e a coinoculação sobre a nodulação, produtividade e qualidade de grãos de soja. Foram conduzidos quatro experimentos durante as safras agrícolas 2017/2018 e 2018/2019, sendo dois em Santa Maria e dois em Augusto Pestana, Rio Grande do Sul, Brasil. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, e os tratamentos foram distribuídos em um fatorial 3 x 4, combinando três inoculações [Testemunha (não inoculado), Inoculação com *Bradyrhizobium* spp., e Coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. + *Azospirillum brasilense*] com quatro doses de S (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Avaliou-se a nodulação das plantas, o acúmulo de massa seca na parte aérea, os componentes da produtividade, e a qualidade de grãos de soja. A aplicação de S-elementar é uma alternativa para disponibilizar sulfato às plantas, promovendo a nodulação, o acúmulo de massa seca de plantas, a produtividade e a qualidade de grãos de soja, além de beneficiar a nodulação quando combinado com a coinoculação.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. *Bradyrhizobium* spp. Enxofre elementar. Óleo. Proteína.

INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a principal *commoditie* do mercado brasileiro (CONAB, 2018). O interesse mundial pela soja deve-se à composição química do grão, que possui elevado teor de proteína (36 %) e óleo (18 %) (MAHMOUD et al., 2006). A partir da moagem do grão de soja obtém-se o farelo de soja, rico em proteína, sendo utilizado como fonte proteica para a alimentação animal, e o óleo de soja, que é a principal matéria prima na produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2018) e nos Estados Unidos (EIA, 2019).

Devido ao melhoramento genético obteve-se aumento na produtividade e redução no teor de proteína dos grãos ao longo dos anos (MAHMOUD et al., 2006; KRISHNAN; JEZ, 2018). Esta redução acarreta em implicações comerciais para o farelo de soja, devido ao não atendimento de exigências para mercado interno regulamentadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA - Portaria 795, e para exportações pela Associação Nacional dos Exportadores de Cereais – ANEC.

O aumento da concentração de proteína nos grãos de soja demanda maior absorção de nitrogênio (N) pela cultura. Este N provém principalmente da fixação biológica de nitrogênio (FBN), que consiste na conversão biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3^+), processo realizado principalmente por bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* spp. (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2015; POOLE, RAMACHANDRAN, TERPOLILLI, 2018). Além destas, as bactérias *Azospirillum brasilense* são utilizadas na coinoculação das sementes com *Bradyrhizobium* spp. (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). *A. brasilense* pertencem a um grupo conhecido por bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), pois beneficiam às plantas por diversos mecanismos, dentre eles, FBN (ASHRAF; RASOOL; MIRZA, 2011), indução de resistência a doenças (WANG et al., 2009), solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004), e produção de fitormônios de crescimento, principalmente auxinas (FUKAMI et al., 2018) e giberelinas (CÁSSAN et al., 2009). Os fitormônios provocam alterações morfológicas e fisiológicas nos tecidos dos vegetais, promovendo maior desenvolvimento inicial (CÁSSAN et al., 2009), aumentando o

sistema radicular (DEAK et al., 2019), permitindo maior disponibilidade hídrica (COHEN et al. 2015), maior nodulação inicial e produtividade de grãos (FIPKE et al., 2016).

Além do N, teores adequados de enxofre (S) são indispensáveis para a soja. Este nutriente é constituinte dos aminoácidos essenciais cisteína e metionina (KRISHNAN; JEZ, 2018), que são utilizados na formação e atividade da ferredoxina (SHERER et al., 2008), e do complexo nitrogenase no nódulo que realiza a redução do N_2 a NH_3^+ (SCHNEIDER et al., 2019). Porém, tem-se observado que em torno de 50 % dos solos do Rio Grande do Sul (RS) encontram-se com níveis de S abaixo do crítico para o cultivo de soja (ALVAREZ, 2004) que é de 10 mg de sulfato (SO_4^{-2}) por dm^{-3} de solo (CQFS, 2016). Nestes solos pode ocorrer redução no potencial produtivo da cultura, bem como no teor de proteína nos grãos (BECANA et al., 2018).

O S pode ser aplicado ao solo na forma de SO_4^{-2} , estando prontamente disponível para absorção pelas plantas, porém com elevada mobilidade no solo, ocasionando perdas por lixiviação, principalmente em solos arenosos (JEMAL et al., 2010). Como alternativa, tem-se o enxofre elementar (S-elementar), que para se tornar disponível às plantas precisa ser oxidado a SO_4^{-2} (HOROWITZ; MEURER, 2007), processo realizado por microrganismos do solo, assim a disponibilidade é lenta em relação ao SO_4^{-2} , pois é dependente de condições de solo favoráveis (LOPES et al., 2017).

Objetivou-se com esta pesquisa, avaliar a relação do S-elementar com a inoculação e a coinoculação sobre a nodulação, produtividade e qualidade de grãos de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

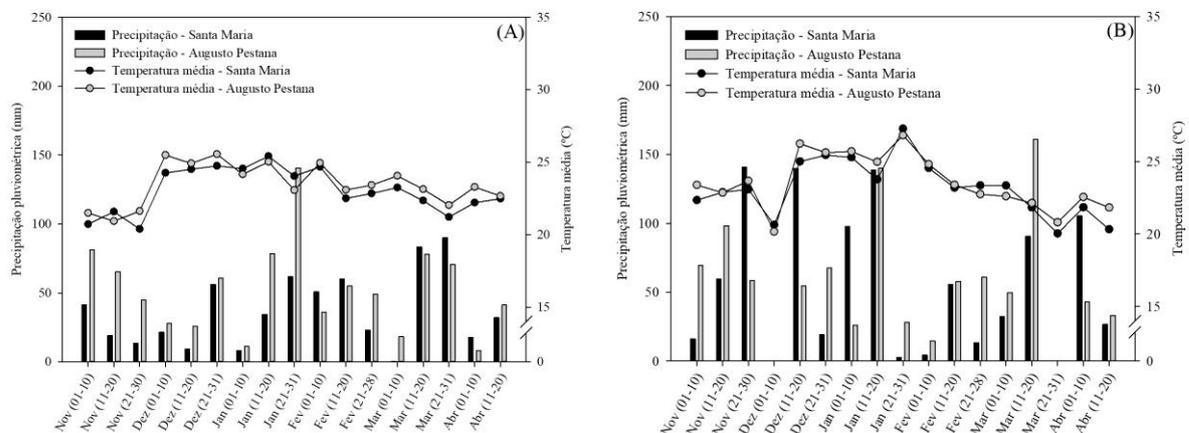
Descrição dos locais

Foram conduzidos quatro experimentos a campo, sendo dois na safra agrícola 2017/2018 e dois na safra 2018/2019, em dois locais. Dois experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), situado no município de Santa Maria, RS, Brasil (29°71'S, 53°70'W, altitude de 116 metros). O solo é

classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (EMBRAPA, 2018) [Ultisol (USDA, 2014)], com 59,9 % de areia, 27,4 % de silte e 12,6 % de argila. Os mesmos experimentos foram conduzidos no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR), vinculado ao Departamento de Estudos Agrários (DEAg), da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), situado no município de Augusto Pestana (Augusto Pestana), RS, Brasil (28°43'S, 54°00'W, altitude de 448 metros). O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférrico típico (EMBRAPA, 2018) [Oxisol (USDA, 2014)], com 15,9 % de areia, 27,5 % de silte e 56,6 % de argila. O clima é do tipo Cfa, subtropical úmido com verões quentes e chuvas bem distribuídas, conforme a classificação de Köppen (ALVARES et al., 2014).

Antes da aplicação dos tratamentos foi realizada amostragem do solo na camada de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm de profundidade para determinação dos atributos químicos (Tabela 1). A precipitação pluvial e a temperatura média para o período de condução dos experimentos estão representados na Figura 1. Durante o período de condução dos experimentos houve um acumulado de 526 mm de chuva para Santa Maria, e 660 mm para Augusto Pestana para a safra 2017/2018. Na safra 2018/2019 a precipitação acumulada durante o ciclo de cultivo foi de 811 mm para Santa Maria, e de 719 mm para Augusto Pestana.

Figura 1 – Precipitação pluvial e temperatura média do ar em Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 (A) e 2018/2019 (B).



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR).

Tabela 1 – Características químicas do solo das áreas experimentais de Santa Maria e Augusto Pestana antes da instalação dos experimentos. Safras 2017/2018 e 2018/2019.

Local	Camada ¹ cm	ARG %	pH _{H₂O} 1:1	MO %	P --- mg dm ⁻³ ---	K ---	S ---	Ca	Mg	Al	CTC _{pH 7} ----- cmol _c dm ⁻³ -----
Santa Maria	0 – 10	18,0	4,7	2,0	37,2	108,0	16,8	2,2	0,6	1,0	10,0
2017/2018	10 – 20	21,0	4,7	1,2	18,4	64,0	7,9	1,8	0,5	1,1	10,2
Augusto Pestana	0 – 10	56,0	5,1	2,9	49,3	248,0	6,7	4,1	1,3	0,5	10,4
2017/2018	10 – 20	64,0	5,1	2,1	28,1	224,0	9,8	3,6	1,2	0,5	9,7
Santa Maria	0 – 10	21,0	4,1	1,9	36,1	104,0	4,0	1,1	0,5	2,2	26,3
2018/2019	10 – 20	26,0	4,7	1,7	28,2	84,0	4,7	1,0	0,4	2,2	28,9
Augusto Pestana	0 – 10	51,0	5,5	2,7	24,1	112,0	2,9	6,7	2,7	0,0	15,9
2018/2019	10 – 20	54,0	5,7	2,1	11,3	72,0	6,7	6,5	2,6	0,0	14,2

¹Camada – camada de solo coletada (cm); ARG – argila (%; m/v); pH_{H₂O} – (água, 1:1); MO – matéria orgânica (%; m/v); P – fósforo (P-Mehlich, mg dm⁻³); K – potássio (mg dm⁻³), S – sulfato (mg dm⁻³); Ca – cálcio (cmol_c dm⁻³); Mg – magnésio (cmol_c dm⁻³); Al – alumínio (cmol_c dm⁻³); CTC – capacidade de troca de cátions (CTC_{pH 7}, cmol_c dm⁻³).

Manejo experimental

O trigo foi a cultura antecedente à instalação dos experimentos em ambos os locais para o ano agrícola de 2017/2018. No ano de 2018/2019 em Santa Maria a área permaneceu em pousio durante a entressafra, e em Augusto Pestana a área foi cultivada com azevém (*Lolium multiflorum*) utilizado para o pastejo de bovinos. Em todos os experimentos antes da semeadura da soja foram realizadas aplicações sequenciais de herbicidas afim de controlar plantas daninhas, sendo a primeira aplicação com herbicidas a base de *glyphosate* [Roundup[®], 1440 g de ingrediente ativo (i.a.) ha⁻¹] + *2,4d* (2,4-D Nortox[®], 1209 g i.a. ha⁻¹), e a segunda aplicação 14 dias (± 3 dias) após, com herbicida a base de *paraquat* (Gramoxone[®], 400 g i.a. ha⁻¹).

A cultivar utilizada foi a Nidera 5959 IPRO pertencente ao grupo de maturação relativa 5.9, com tipo de crescimento indeterminado. O tratamento fitossanitário de sementes (TS) foi realizado com produto comercial contendo fungicida e inseticida, formulado a base de *piraclostrobina*, *tiofanato metílico* e *fipronil* (Standak Top[®], 0,05 - 0,45 - 0,5 g i.a. kg sementes⁻¹). O TS foi realizado com o auxílio de sacos plásticos (volume de 10 L). Foram tratados dois quilogramas (kg) de sementes, utilizando seis mL de calda por kg de sementes,

agitando a embalagem manualmente até obter uniformidade do produto sobre as sementes. A semeadura foi realizada nos dias 30/11/2017 e 01/12/2017 para Santa Maria e Augusto Pestana respectivamente para a safra 2017/2018, e nos dias 01/11/2018 e 21/11/2018 para Santa Maria e Augusto Pestana respectivamente na safra 2018/2019. A densidade de semeadura foi ajustada para 340.000 sementes viáveis por hectare, conforme recomendações da empresa obtentora da cultivar (Nidera Sementes).

A adubação foi realizada via sulco de semeadura, ajustada para expectativa de produtividade de cinco toneladas por hectare para ambos experimentos (CQFS-RS/SC, 2016). Afim de evitar a utilização de S na semeadura, foi utilizada a mistura de superfosfato triplo (46 %, P_2O_5) com cloreto de potássio (60 %, K_2O), a homogeneização foi realizada manualmente na proporção 1:1, originando a formulação 00-23-30 (N- P_2O_5 - K_2O). Os demais manejos fitossanitários foram realizados conforme as indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (REUNIÃO... 2016).

Unidade experimental, delineamento e tratamentos

Em Santa Maria as unidades experimentais (UE) foram constituídas por cinco fileiras de semeadura com espaçamento de 0,45 m entre fileiras por 7,75 m de comprimento, totalizando 17,43 m², sendo colhidas as três fileiras centrais por 5,00 m de comprimento, totalizando 6,75 m² de área útil de colheita. Em Augusto Pestana as UE foram formadas por sete fileiras de semeadura com espaçamento de 0,45 m entre fileiras por 5,00 m de comprimento, totalizando 15,75 m², sendo colhidas as três fileiras centrais de cada parcela por 4,50 m de comprimento, totalizando 6,07 m² de área útil de colheita.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram distribuídos em um fatorial (3 x 4), avaliando três inoculações [Testemunha (não inoculado), Inoculação (*Bradyrhizobium* spp.) e coinoculação (*Bradyrhizobium* spp. + *A. brasilense*)], e quatro doses de S (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹).

A inoculação com *Bradyrhizobium* foi realizada com produto comercial (TotalNitro_{max}[®], Total Biotecnologia) de formulação líquida com garantias de 7×10^9 unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹ de produto comercial) de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 15 (SEMIA 5079) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CPAC 7 (SEMIA 5080), na dose de dois mL kg⁻¹ de sementes. Nos tratamentos com *Azospirillum* foi utilizado produto comercial (AzoTotal_{max}[®], Total Biotecnologia) com formulação líquida contendo *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com garantias de 2×10^8 UFC mL⁻¹, na dose de dois mL kg⁻¹ de sementes. Foram inoculados dois kg de sementes com seis mL de calda kg⁻¹, com o mesmo procedimento adotado no TS. A inoculação foi realizada 24 horas após o TS, após a inoculação as sementes foram deixadas secar à sombra por 30 minutos até a semeadura.

Nos experimentos da safra 2017/2018 a aplicação dos tratamentos com S foi realizada 20 dias antes da semeadura, e nos experimentos da safra 2018/2019 os tratamentos com S foram aplicados no dia da semeadura, em ambos experimentos foi realizada aplicação manual a lanço de S sobre a UE, com produto formulado contendo 90 % de S-elementar pastilhado com partículas medindo dois milímetros (mm) por quatro mm (Sulfurgran[®]). Durante o ciclo da cultura foram realizadas amostragens do solo em três momentos (pré-semeadura, floração plena e pós colheita), afim de verificar a disponibilidade de SO₄⁻² durante o período de cultivo e o efeito residual do S-elementar no solo na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm.

Foi utilizado o extrator a base de fosfato de cálcio Ca(H₂PO₄)₂ contendo 500 mg L⁻¹ de P (CQFS-RS/SC, 2016). Em seguida é feita a digestão do extrato com ácido perclórico e a determinação do teor de sulfato por turbidimetria com cloreto de bário, a quantificação é realizada por espectrofotômetro da turbidez formada pela precipitação do sulfato (FOX et al., 1987). Os valores obtidos são expressos em mg de SO₄⁻² por dm³, e então interpretados de acordo com a CQFS-RS/SC (2016), classificando o teor em baixo (≤ 2 mg dm⁻³), médio (2,1 a 5,0 mg dm⁻³) e alto (> 5 mg dm⁻³), estes valores servem de referência para a maioria das culturas, exceto para leguminosas, brassicaceas e liliáceas, para estes grupos de culturas para ser considerado como alto o teor de sulfato precisa estar acima de 10 mg dm³.

Variáveis analisadas

No estágio fenológico R2 (florescimento pleno) (FEHR; CAVINESS, 1977) foram coletadas quatro plantas por UE para contagem do *número de nódulos por planta* (NN, n° planta⁻¹). Posteriormente os nódulos foram lavados e levados à estufa de circulação de ar forçada a temperatura de 60 °C ± 5 °C até atingir massa constante, então determinada a *massa seca de nódulos por planta* (MSN, mg planta⁻¹) em balança com precisão de 0,001 g. A parte aérea das plantas coletadas para a contagem de nódulos foi acondicionada em sacos de papel kraft e colocada para secar em estufa de circulação de ar forçada a temperatura de 60 °C ± 5 °C até atingir massa constante para posterior pesagem e determinação da *massa seca de parte aérea* (MSP, g planta⁻¹).

No estágio R8 foi realizada a amostragem de quatro plantas por parcela, e contabilizado o *número de vagens por planta* (NV, n° planta⁻¹). Após o estágio R8 foi realizado o monitoramento da umidade na massa de grãos para realizar a colheita em torno de 13 %. A colheita foi realizada com o auxílio de uma motosegadeira, posteriormente as amostras foram trilhadas, limpas e pesadas, aferindo o teor de umidade e corrigindo para 13 % (base seca) para determinar a *produtividade de grãos* (PG, kg ha⁻¹). A partir da massa de grãos foram contabilizados e aferida a massa de 300 grãos por amostra para determinar a *massa de mil grãos* (MMG, g 1000).

Após a colheita, os grãos das quatro repetições de cada tratamento foram agrupados e homogeneizados, deste material foi retirada uma amostra de 0,5 kg, que foi analisada por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para determinar o *teor de proteína bruta* (PB, %) e *teor óleo* (ÓLEO, %) na massa de grãos. Os resultados das variáveis de qualidade de grãos foram analisados como delineamento inteiramente casualizado (DIC), formando três repetições originadas da amostra de 0,5 kg.

Os resultados da produtividade de grãos para as doses de S foram utilizados para determinar a eficiência agrônômica (EA), que é um indicativo da produtividade de grãos por

unidade de S aplicada. Foi utilizada a metodologia proposta por Fageria et al. (1998), em que: $EA = (PG \text{ com fertilizante} - PG \text{ sem fertilizante}) / (\text{kg de nutriente aplicado})$. Baseando-se nos dados de EA, foi realizada uma análise de viabilidade econômica (VE) da aplicação de S.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de F. Quando significativos foi realizada análise de regressão para as doses de S, e teste de comparação de médias de Scott-Knott a 5 % de probabilidade para as inoculações, observando as interações. As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Teor de SO_4^{-2} no solo

Na safra 2017/2018, antes da aplicação dos tratamentos o teor médio de SO_4^{-2} na camada de 0 a 10 cm era de 16,8 e 6,7 mg dm^{-3} para os experimentos de Santa Maria e Augusto Pestana respectivamente (Tabela 2). Para a safra 2018/2019, em Santa Maria o teor de SO_4^{-2} estava em 4,0 mg dm^{-3} , e em Augusto Pestana em 2,9 mg dm^{-3} (Tabela 2). Com excessão da área de Santa Maria na safra 2017/2018, as demais áreas estavam com níveis de SO_4^{-2} abaixo do indicado para o cultivo de soja que é de 10 mg dm^{-3} (CQFS-RS/SC (2016)).

Tabela 2 – Teor de sulfato no solo ao longo do ciclo de cultivo, para Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 e 2018/2019.

Local - safra	Momento de coleta	Camada (cm)	Dose de enxofre (kg ha ⁻¹)			
			0	20	40	60
Santa Maria - 2017/2018			Teor de SO ₄ ²⁻ no solo (mg dm ⁻³)			
Semeadura (20 DAAS) ¹	0 – 10		16,8 ²	23,5	28,2	23,3
	10 – 20		7,9	18,7	14,6	4,7
Florescimento (60 DAAS)	0 – 10		17,3	9,6	9,4	8,0
	10 – 20		15,7	4,0	1,4	2,2
Colheita (150 DAAS)	0 – 10		2,8	3,8	9,3	8,9
	10 – 20		0,7	1,3	1,2	1,1
Augusto Pestana – 2017/2018						
Semeadura (20 DAAS)	0 – 10		6,7	8,8	8,4	17,3
	10 – 20		9,8	10,7	9,9	15,7
Florescimento (60 DAAS)	0 – 10		2,6	8,3	12,2	12,2
	10 – 20		7,9	11,0	10,2	11,6
Colheita (150 DAAS)	0 – 10		2,2	7,9	2,5	10,0
	10 – 20		1,5	11,0	8,8	12,1
Santa Maria – 2018/2019						
Semeadura (0 DAAS)	0 – 10		4,0	4,0	4,0	4,0
	10 – 20		4,7	4,7	4,7	4,7
Florescimento (60 DAAS)	0 – 10		6,2	6,0	8,6	7,4
	10 – 20		5,8	7,7	5,9	5,7
Colheita (130 DAAS)	0 – 10		6,5	8,6	6,3	8,4
	10 – 20		4,5	6,6	4,5	5,2
Augusto Pestana – 2018/2019						
Semeadura (0 DAAS)	0 – 10		2,9	2,9	2,9	2,9
	10 – 20		6,7	6,7	6,7	6,7
Florescimento (60 DAAS)	0 – 10		9,6	9,4	6,9	7,5
	10 – 20		7,1	7,7	8,7	5,1
Colheita (130 DAAS)	0 – 10		9,5	7,0	5,7	9,1
	10 – 20		5,6	4,3	6,3	7,4

¹Dias após a aplicação de enxofre elementar (DAAS), ²extrator fosfato de cálcio Ca(H₂PO₄)₂ (CQFS-RS/SC, 2016).

Para a safra 2017/2018, no experimento de Santa Maria na semeadura [20 dias após a aplicação de S (DAAS)] observa-se que o teor de SO₄²⁻ no solo na profundidade de 0 a 10 cm estava acima do nível de suficiência para a cultura da soja em todas as doses de S aplicadas (Tabela 2). Neste experimento a aplicação de 20 kg ha⁻¹ de S foi suficiente para elevar o teor

de SO_4^{-2} acima de 20 mg dm^{-3} (CQFS-RS/SC, 2016). Logo, nas avaliações posteriores, no florescimento pleno (60 DAAS) e na colheita (150 DAAS) o nível de suficiência não foi mantido, permanecendo apenas próximo a este nas doses 40 e 60 kg de S ha^{-1} , que apresentaram 9,3 e 8,9 mg de $\text{SO}_4^{-2} \text{ dm}^{-3}$ na camada de 0 a 10 cm de profundidade aos 150 DAAS. Para o experimento de Augusto Pestana aos 20 DAAS apenas na dose de 60 kg ha^{-1} de S foi possível atingir o nível de suficiência para a cultura, chegando a 17,3 mg de $\text{SO}_4^{-2} \text{ dm}^{-3}$ (Tabela 2). Na avaliação realizada aos 60 DAAS, o nível de suficiência foi alcançado na dose 40 e 60 kg ha^{-1} de S, e aos 150 DAAS apenas a dose 60 kg ha^{-1} de S manteve-se acima do nível crítico para a cultura da soja.

Na safra 2018/2019 como a aplicação de S foi realizada no momento da semeadura, os efeitos no teor de SO_4^{-2} devem ser observados apenas na avaliação realizada no florescimento da cultura (60 DAAS). Nesta safra, nos dois experimentos não foi possível alcançar o nível crítico de SO_4^{-2} para a cultura da soja (Tabela 2). Possivelmente, a precipitação pluvial acumulada após a aplicação do S-elementar proporcionou condições favoráveis para a total oxidação do mesmo a SO_4^{-2} (Figura 1B). Porém, pode ter favorecido a lixiviação de SO_4^{-2} para camadas abaixo dos 20 cm de profundidade, fora do alcance do sistema radicular.

Análise de variância

Os resultados da ANOVA para a safra 2017/2018 demonstram que no experimento de Santa Maria houve interação entre inoculações e doses de S para as variáveis MSN, MSP, ÓLEO e PB, enquanto para a variável NN houve efeito principal das inoculações e doses, e para as variáveis NV e PG houve efeito do fator doses (Tabela 3). Para o experimento de Augusto Pestana houve interação entre inoculações e doses para as variáveis ÓLEO e PB, e para as variáveis NN, MSN, NV e PG houve efeito significativo para as doses.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para os experimentos de Santa Maria e Augusto Pestana. Safras 2017/2018 e 2018/2019.

Santa Maria – 2017/2018									
FV ¹	GL ³	NN ⁴	MSN	MSP	NV	MMG	PG	PB	ÓLEO
Bloco	3	17,39 ^{ns}	478,72 ^{ns}	1,22 ^{ns}	2,77 ^{ns}	249,04*	198432,37 ^{ns}	-	-
Inoculação (INO)	6	523,74*	5912,03*	3,78*	2,31 ^{ns}	79,97 ^{ns}	143248,92 ^{ns}	2,04*	0,60*
Enxofre (S)	3	1968,59*	6805,54*	2,49*	63,91*	42,71 ^{ns}	326795,08*	1,18*	0,10 ^{ns}
INO x S	6	268,98 ^{ns}	2007,33*	4,28*	29,00 ^{ns}	58,68 ^{ns}	73161,66 ^{ns}	2,42*	0,38*
Erro	33/24	150,05	464,98	0,65	16,91	54,04	112756,76	0,05	0,05
Média	-	86,02	246,15	7,99	41,89	191,77	4645,19	33,10	19,80
CV (%) ²	-	14,24	8,76	10,12	9,81	3,83	7,23	0,68	1,23
Augusto Pestana - 2017/2018									
Bloco	3	112,04 ^{ns}	458,61 ^{ns}	0,26 ^{ns}	56,87 ^{ns}	68,86*	689529,63*	-	-
Inoculação (INO)	6	37,63 ^{ns}	8497,25 ^{ns}	0,33 ^{ns}	44,57 ^{ns}	22,69 ^{ns}	69443,60 ^{ns}	1,54*	0,15*
Enxofre (S)	3	866,93*	72,75*	0,73 ^{ns}	166,07*	31,23 ^{ns}	355640,54*	1,14*	0,41*
INO x S	6	9,89 ^{ns}	553,54 ^{ns}	0,52 ^{ns}	37,66 ^{ns}	13,27 ^{ns}	80441,33 ^{ns}	0,66*	0,36*
Erro	33/24	78,41	444,09	0,59	31,85	15,82	65629,94	0,00	0,06
Média	-	60,86	153,95	5,13	41,30	151,69	3982,33	32,79	19,64
CV (%) ²	-	14,56	13,69	14,97	13,66	2,62	6,43	0,17	1,27
Santa Maria - 2018/2019									
Bloco	3	96,33 ^{ns}	20513,91*	28,55*	438,76*	46,70 ^{ns}	252199,87*	-	-
Inoculação (INO)	6	447,86*	972,24 ^{ns}	9,52 ^{ns}	270,05*	47,13 ^{ns}	34366,81 ^{ns}	0,85*	0,15 ^{ns}
Enxofre (S)	3	447,47*	1991,27 ^{ns}	12,21 ^{ns}	14,01 ^{ns}	23,33 ^{ns}	10199,91 ^{ns}	0,24*	0,05 ^{ns}
INO x S	6	234,32 ^{ns}	11967,18 ^{ns}	6,52 ^{ns}	80,18 ^{ns}	3,85 ^{ns}	67866,62 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,28*
Erro	33/24	102,28	5987,56	5,32	47,60	17,01	49496,62	0,06	0,05
Média	-	62,94	317,65	20,25	59,79	172,85	4480,34	33,37	20,61
CV (%) ²	-	16,07	24,36	11,39	11,54	2,39	4,97	0,78	1,10
Augusto Pestana - 2018/2019									
Bloco	3	59,45 ^{ns}	320,81 ^{ns}	5,85 ^{ns}	6,38 ^{ns}	21,16 ^{ns}	20889,74 ^{ns}	-	-
Inoculação (INO)	6	105,59 ^{ns}	284,59 ^{ns}	5,34 ^{ns}	8,62 ^{ns}	67,88 ^{ns}	113944,68 ^{ns}	0,78*	0,32*
Enxofre (S)	3	1948,29*	2855,28*	21,83*	21,36 ^{ns}	64,72 ^{ns}	51937,30 ^{ns}	1,19*	1,37*
INO x S	6	473,49 ^{ns}	1263,41 ^{ns}	6,21 ^{ns}	39,89 ^{ns}	18,23 ^{ns}	6855,28 ^{ns}	0,36*	0,06 ^{ns}
Erro	33/24	204,50	919,00	3,03	27,03	24,95	71329,87	0,09	0,07
Média	-	72,11	152,90	13,00	40,39	159,53	3799,84	32,79	20,16
CV (%) ²	-	19,83	19,83	13,39	12,87	3,13	7,03	0,92	1,35

¹Fonte de variação (FV), ²coeficiente de variação (CV%), ³graus de liberdade do erro (GL) [GL para variáveis de nodulação e produtividade (33) e variáveis de qualidade de grãos (24)], ⁴Variáveis explicativas: número de nódulos por planta (NN, n° planta⁻¹), massa seca de nódulos por planta (MSN, mg planta⁻¹), massa seca de parte aérea (MSP, g planta⁻¹), número de vagens por planta (NV, n° planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g 1000), produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), teor de proteína bruta (PB, %), e teor de óleo (OLEO, %). *significativo e ^{ns}não significativo pelo teste de F ($\alpha \leq 0,05$).

Para a safra 2018/2019 no experimento de Santa Maria houve interação entre inoculações e doses de S para a variável ÓLEO, e para as variáveis NN e PB houve efeito significativo para os fatores principais, e para NV as inoculações apresentaram efeito significativo (Tabela 3). No experimento de Augusto Pestana observou-se efeito significativo apenas para os fatores principais, sendo que as variáveis NN, MSN, MSP e ÓLEO foram significativas para doses de S, e para as inoculações apenas a variável ÓLEO foi significativa, ainda observou-se interação entre os fatores para a variável PB.

Nodulação de plantas

Em Santa Maria o NN foi influenciado pelas doses de S e pelas inoculações nos dois anos de condução dos experimentos. A inoculação com *Bradyrhizobium* spp. não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento testemunha em ambos experimentos de Santa Maria, e a coinoculação com média de 92,11 nódulos por planta foi 14 % e 8 % superior à testemunha e à inoculação, que apresentaram 80,76 e 85,19 nódulos por planta respectivamente (Figura 2A). Para a safra 2018/2019 a coinoculação com 69,04 nódulos por planta foi em média 15 % superior a inoculação com 59,67 nódulos e a testemunha com 60,10 nódulos (Figura 4A). A maior nodulação no tratamento coinoculado está associada ao modo de ação do *A. brasilense*, que atua produzindo fitormônios de crescimento (CASSÁN et al., 2009), promovendo aumento no sistema radicular (DEAK et al., 2019), consequentemente aumentando a nodulação, bem como a produtividade de grãos (CEREZINI et al., 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

A utilização de S promoveu incremento no NN em todos os experimentos. Na safra 2017/2018 no experimento de Santa Maria a máxima eficiência técnica (MET) foi alcançada com a aplicação de 31 kg ha⁻¹ de S, com média de 99,63 nódulos por planta, em relação a 73,22 nódulos por planta na dose zero, indicando incremento de 36 % (Figura 2B). Porém observa-se declínio na formação de nódulos em doses superiores aos 40 kg ha⁻¹ de S, decrescendo para 77,14 nódulos por planta na dose de 60 kg ha⁻¹ de S, valor semelhante ao

observado na dose zero. Este decréscimo possivelmente deve-se a menor disponibilidade de SO_4^{-2} . A oxidação do S-elementar gera elementos ácidos que podem se tornar tóxicos aos microrganismos responsáveis pela sua oxidação, podendo resultar na inibição da conversão de S-elementar em SO_4^{-2} (HOROWITZ; MEURER, 2006). Além disso, a liberação de ácidos durante o processo de oxidação causa redução no pH do solo (KARIMIZARCHI et al., 2014), prejudicando a formação de nódulos (STECCA et al., 2019), além de limitar a produtividade de grãos quando em valores abaixo de 5,5 (CQFS, 2016). Como pode se observar, o teor de SO_4^{-2} observado com a aplicação de 60 kg ha^{-1} de S, foi inferior à dose de 20 e 40 kg ha^{-1} de S no período entre semeadura e florescimento da cultura (Tabela 2).

Para os demais experimentos houve ajuste linear crescente para o NN, obtendo-se a MET com a utilização da dose de 60 kg ha^{-1} . Para o experimento realizado em Augusto Pestana na safra 2017/2018 o NN variou de 51,09 nódulos na dose zero, para 70,58 nódulos por planta na dose 60 kg ha^{-1} , representando um incremento de 37 % (Figura 3A). Para os experimentos conduzidos na safra 2018/2019, em Santa Maria houve um aumento de 27 % no NN, passando de 53,97 na dose zero para 68,71 nódulos na dose de 60 kg ha^{-1} (Figura 4B). Em Augusto Pestana na mesma safra o incremento foi de 46 %, variando entre 57,98 nódulos na dose zero e 85,04 na dose de 60 kg ha^{-1} (Figura 5A).

Ao avaliar a taxa de oxidação de S-elementar, Horowitz e Meurer (2006) observaram que em um Argissolo com 10 % de argila a taxa de oxidação foi linear até os 70 dias após a incubação, chegando a $563 \text{ mg de SO}_4^{-2} \text{ dm}^{-3}$, sendo 2,7 vezes superior a taxa de oxidação no Latossolo com 47 % de argila que atingiu o máximo de $207 \text{ mg de SO}_4^{-2} \text{ dm}^{-3}$ no mesmo período de incubação. Deste modo, verifica-se que o teor de argila no solo influencia na taxa de oxidação de S-elementar, como pode ser observado pela disponibilidade de SO_4^{-2} no solo para o primeiro ano de experimentos (Tabela 2).

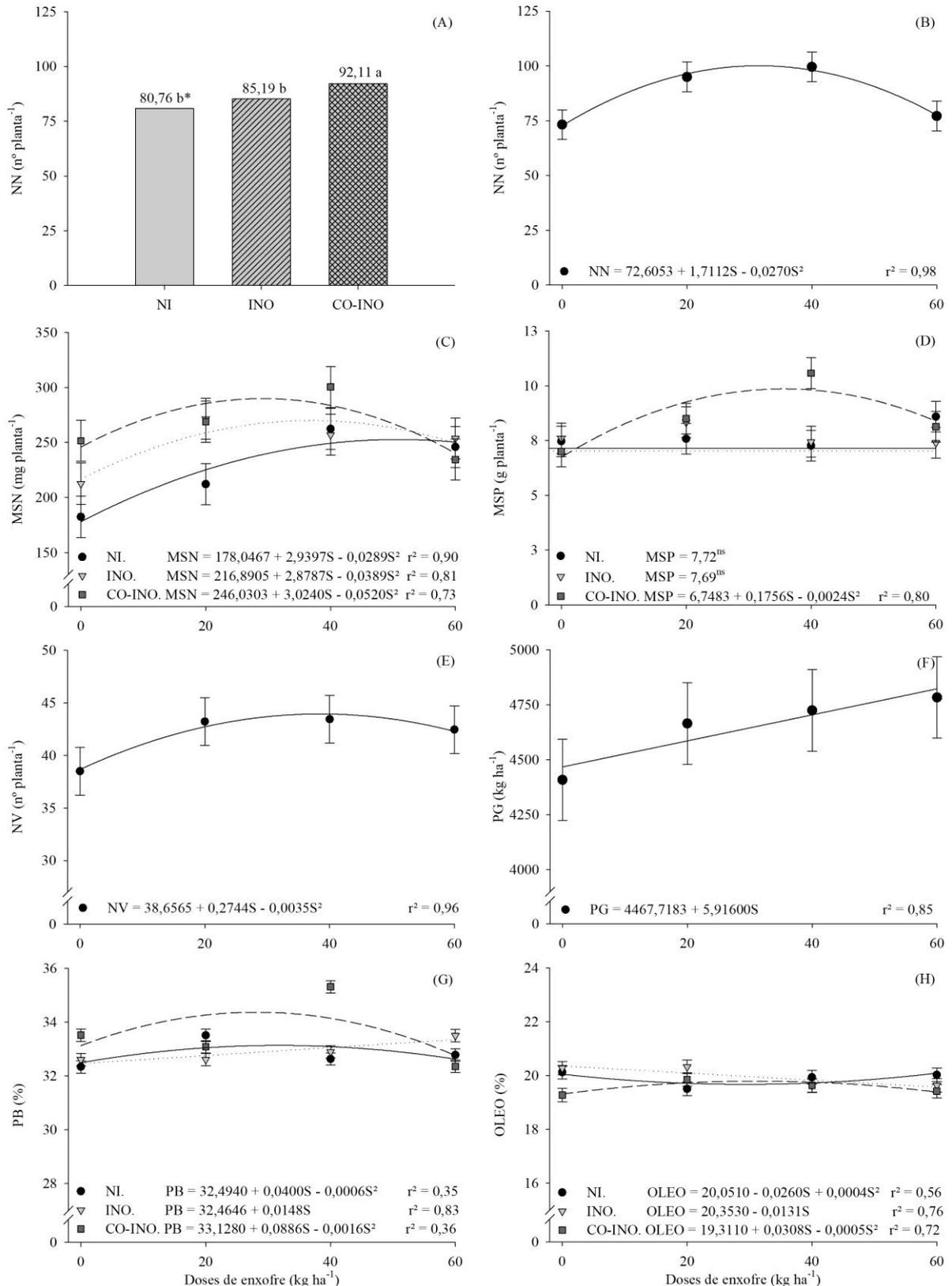
Quanto a MSN na safra 2017/2018 no experimento de Santa Maria houve interação entre inoculações e doses de S, com destaque para a coinoculação que teve 290 mg de nódulos secos por planta na MET com a aplicação de 29 kg S ha^{-1} , contra apenas 252 mg por planta da testemunha que necessitou da aplicação de 51 kg ha^{-1} de S para atingir a MET, ainda assim foi

inferior à coinoculação (Figura 2C). A inoculação foi o tratamento com resultado intermediário entre a testemunha e a coinoculação, com média de 270 mg de nódulos secos, com MET na dose de 37 kg ha⁻¹ de S. Observa-se que as plantas coinoculadas além de produzir a maior MSN, necessitaram de menores doses de S para se igualar aos demais tratamentos. A produção de fitormônios de crescimento (CASSÁN et al., 2009) com a aplicação de *A. brasilense* estimula a produção de pêlos radiculares e o crescimento do sistema radicular (DEAK et al., 2019), explorando maior volume de solo e possibilitando maior absorção de água e nutrientes (ARDAKANI; MAZAHERI, 2011), favorecendo a nodulação e o acúmulo de N na parte aérea (BENINTENDE et al., 2010).

Para os experimentos de Augusto Pestana, em ambos os anos apenas o fator principal doses de S foi significativo para a MSN. Na safra 2017/2018 os valores variaram de 129 mg planta⁻¹ na dose zero para 179 mg planta⁻¹ na dose de 60 kg ha⁻¹ (Figura 3B). Do mesmo modo que para NN esta variável teve a MET na maior dose avaliada, sendo obtido um incremento de 38 % na MSN. Para a safra 2018/2019 na dose zero observou-se nodulação de 130 mg planta⁻¹, elevando-se para 164 mg planta⁻¹ na dose de 60 kg ha⁻¹, representando um incremento de 25 % na MSN (Figura 5B).

O S atua como constituinte de metabólitos secundários envolvidos na produção de fatores de nodulação na planta. Assim, a deficiência de S causa atraso e redução na nodulação de leguminosas (VARIN et al., 2010). Além de reduzir a atividade da nitrogenase devido à menor produção dos aminoácidos cisteína e metionina (SCHNEIDER et al., 2019). Nódulos com deficiência de S possuem menos leghemoglobina, glicose, ATP e ferredoxina, limitando a disponibilidade de oxigênio e energia para a FBN (BECANA; WIENKOOP; MATAMOROS, 2018; SCHERER, 2008; VARIN et al., 2010).

Figura 2 – Número de nódulos (A e B), massa seca de nódulos (C), massa seca de planta (D), número de vagens por planta (E), produtividade de grãos (F), teor de proteína bruta (G), e teor de óleo (H), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Santa Maria (2017/2018).



*médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Figura 3 – Número de nódulos (A), massa seca de nódulos (B), número de vagens por planta (C), produtividade de grãos (D), teor de proteína bruta (E), e teor de óleo (F) em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Augusto Pestana (2017/2018).

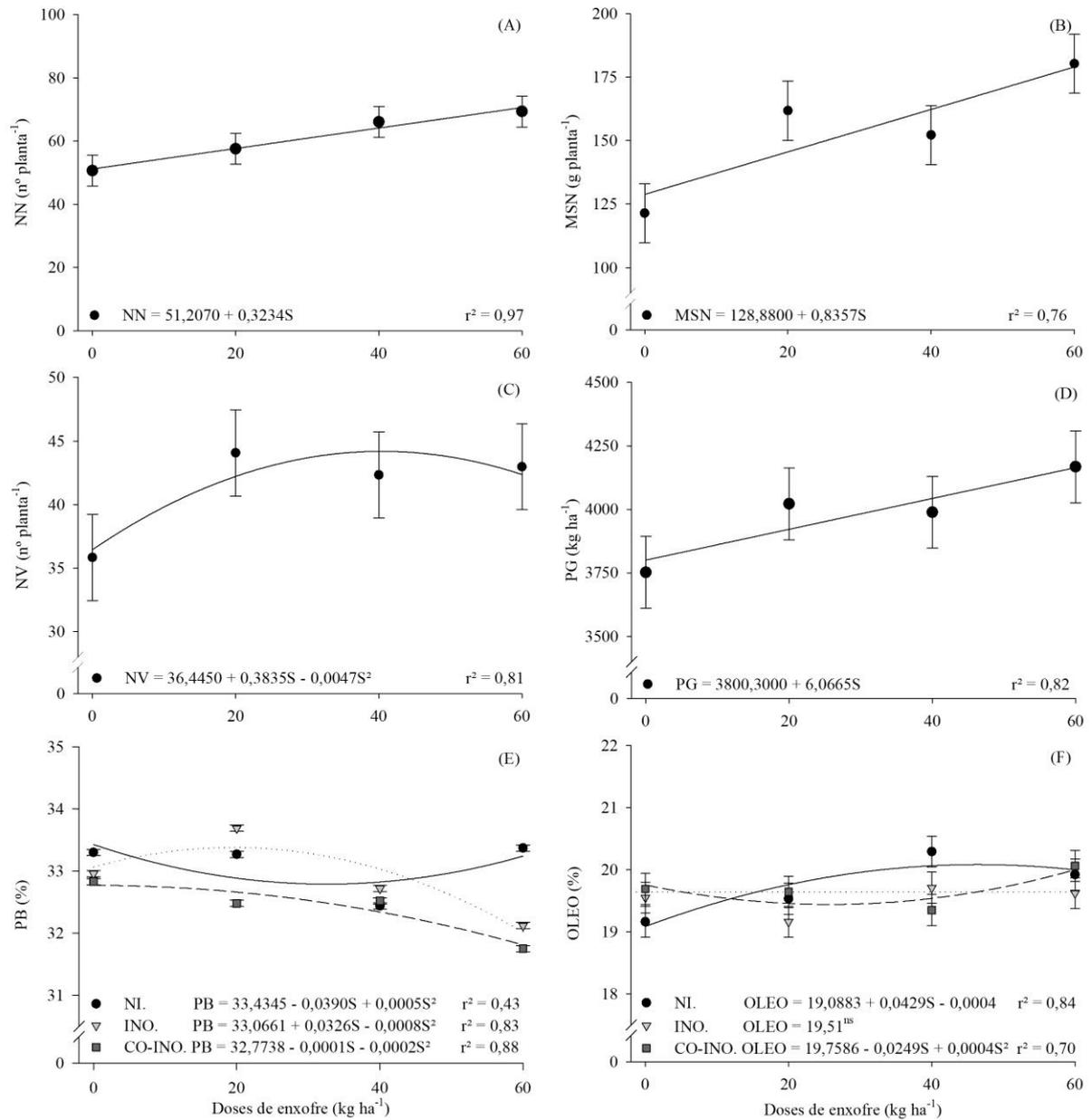
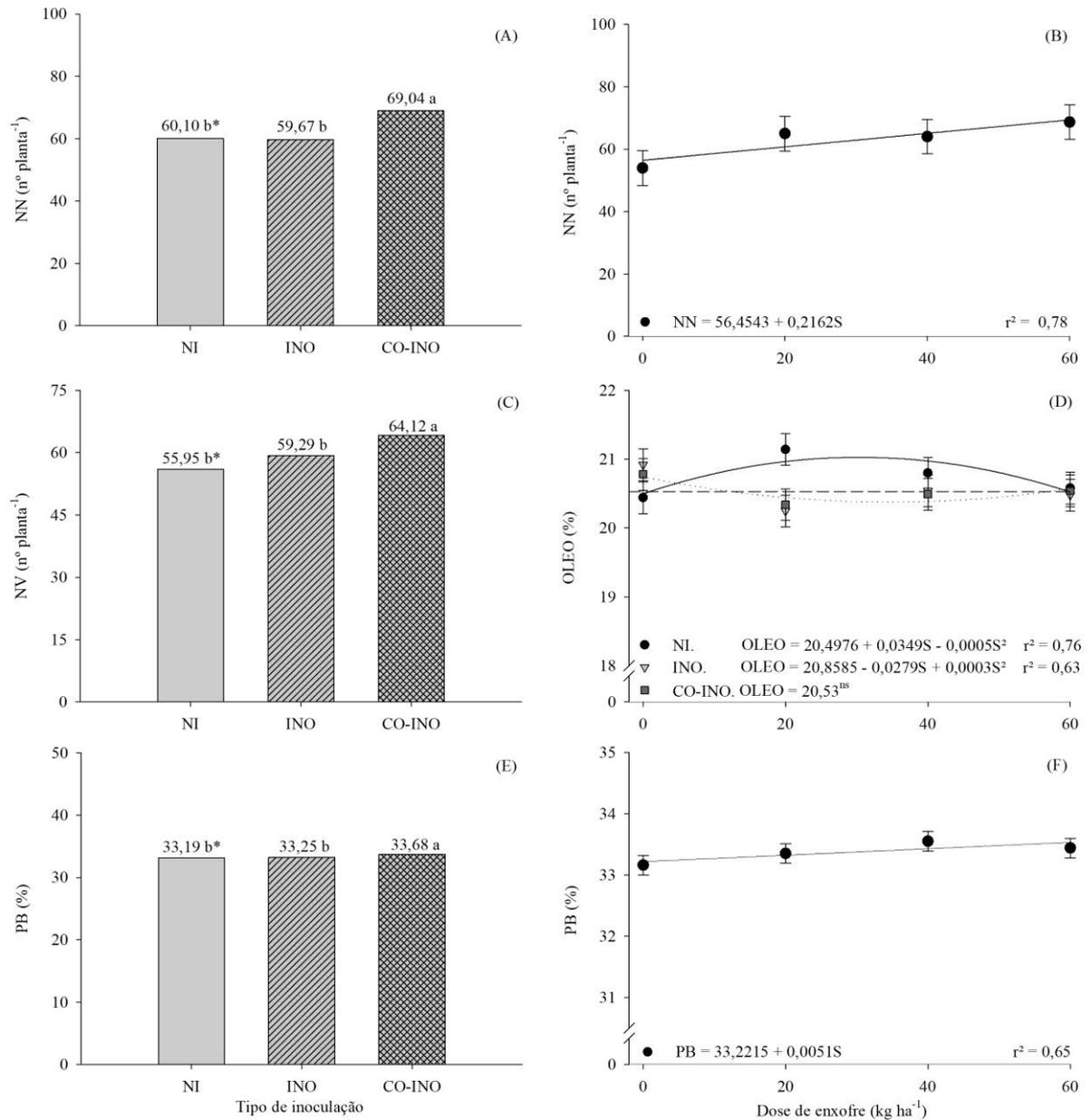
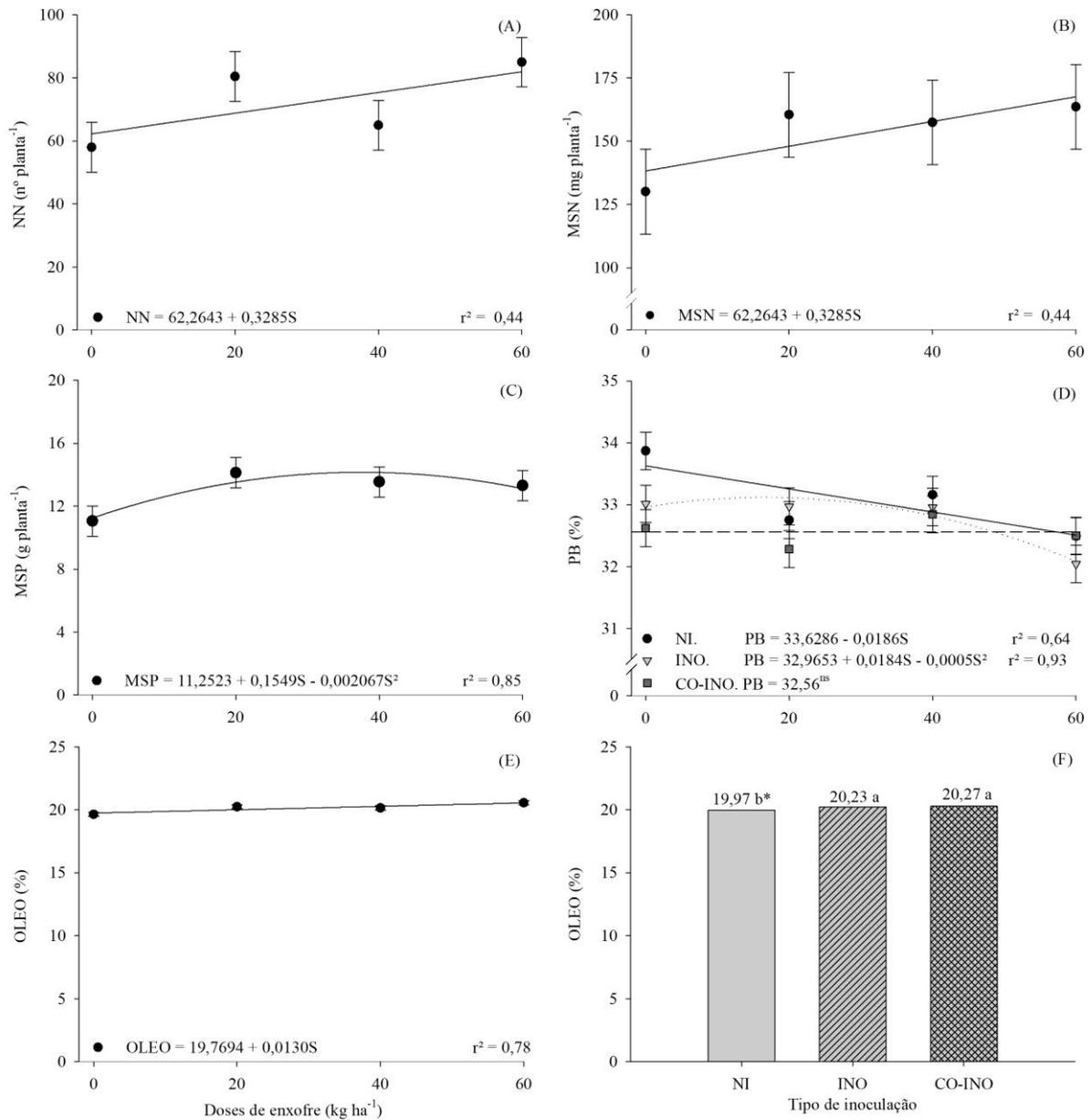


Figura 4 – Número de nódulos (A e B), número de vagens por planta (C), teor de óleo (D), e proteína bruta (E e F), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Santa Maria (2018/2019).



* médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Figura 5 – Número de nódulos (A), massa seca de nódulos (B), massa seca de planta (C), teor de proteína bruta (D), e teor de óleo (E), em função dos tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Augusto Pestana (2018/2019).



*médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Massa seca de plantas

Para a safra 2017/2018 no experimento de Santa Maria, mesmo com nível de SO_4^{2-} acima de 10 mg dm^{-3} houve incremento no acúmulo de MSP para o tratamento coinoculado (Figura 2D). A coinoculação obteve média de $9,86 \text{ g planta}^{-1}$ com a aplicação de $35 \text{ kg de S ha}^{-1}$, sendo 30 % superior aos demais tratamentos que não apresentaram diferença quanto a dose, com média de $7,72 \text{ g planta}^{-1}$ para a testemunha e $7,69 \text{ g planta}^{-1}$ para a inoculação (Figura 2D). Para a safra 2018/2019 houve efeito para as doses de S no experimento de Augusto Pestana com a MET obtida na dose de $37 \text{ kg de S ha}^{-1}$ atingindo $14,15 \text{ g planta}^{-1}$ (Figura 5C).

Hungria, Nogueira e Araujo (2013) também observaram aumento significativo no acúmulo de MSP de soja coinoculada com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense*. O aumento na MSP para o tratamento coinoculado esta relacionado a maior nodulação das plantas (Figura 2A e C), permitindo maior FBN, e conseqüentemente maior acúmulo de fotoassimilados na parte aérea (BENINTENDE et al., 2010; GETACHEW et al., 2017). Além disso, a aplicação de S favorece a FBN e conseqüentemente o acúmulo de MSP, por ser constituinte dos grupos ferro-S da nitrogenase, este nutriente é indispensável para a formação e atividade dos nódulos (UDVARDI et al., 2013).

Componentes da produtividade

Na safra 2017/2018 houve efeito das doses de S no NV, com ajuste quadrático para ambos experimentos, com 43,93 vagens por planta com a aplicação de $38 \text{ kg de S ha}^{-1}$ no experimento de Santa Maria, e 44,18 vagens por planta com a aplicação de $40 \text{ kg de S ha}^{-1}$ no experimento de Augusto Pestana. Para safra 2018/2019 houve efeito significativo para os tipos de inoculações, onde a coinoculação com 64,12 vagens por planta foi superior a testemunha e a inoculação com 55,95 e 59,29 vagens por planta respectivamente (Figura 4C).

Estes resultados não corroboram com os obtidos por Lopes et al. (2017) que não observaram efeito da aplicação de até 100 kg de S ha⁻¹ para estas variáveis. O NV e a MMG são os componentes da produtividade que apresentam maior correlação com a produtividade de grãos (PERINI et al., 2012). Nos experimentos de Augusto Pestana estas variáveis apresentaram correlação positiva com a PG, sendo observado um coeficiente de correlação de 0,39 para o NV na safra 2017/2018, e de 0,41 para a MMG na safra 2018/2019 (Tabela 4).

Tabela 4 – Matriz da correlação de Pearson para variáveis mensuradas após a aplicação de tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO), Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹). Santa Maria (valores acima da diagonal principal) e Augusto Pestana (valores abaixo da diagonal principal). Safras 2017/2018 e 2018/2019.

		2017/2018						
	NN ¹	MSN	MSP	NV	MMG	PG	PB	OLEO
NN	-	0,60*	0,27*	0,24 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,43*	-0,18 ^{ns}
MSN	0,49*	-	0,34*	0,14 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,46*	-0,11 ^{ns}
MSP	0,31*	0,05 ^{ns}	-	0,14 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,49*	0,08 ^{ns}
NV	0,26 ^{ns}	0,52*	-0,34*	-	0,05 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,33*	-0,28*
MMG	0,11 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-	0,20 ^{ns}	-0,00 ^{ns}	-0,03 ^{ns}
PG	0,42*	0,41*	0,01 ^{ns}	0,39*	0,14 ^{ns}	-	-0,14 ^{ns}	0,03 ^{ns}
PB	-0,30*	0,12 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-	-0,39*
OLEO	0,28*	0,22 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,31*	-0,48*	-
		2018/2019						
	NN	MSN	MSP	NV	MMG	PG	PB	OLEO
NN	-	-0,00 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,29*	-0,03 ^{ns}	0,51*	-0,08 ^{ns}
MSN	0,31*	-	-0,05 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,24 ^{ns}
MSP	0,34*	0,26 ^{ns}	-	0,40*	-0,05 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,00 ^{ns}
NV	-0,06 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-	-0,07 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,03 ^{ns}
MMG	-0,01 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-	0,24 ^{ns}	0,29*	-0,15 ^{ns}
PG	0,05 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,41*	-	-0,02 ^{ns}	-0,12 ^{ns}
PB	-0,43*	-0,10 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,19 ^{ns}	-	-0,34*
OLEO	0,47*	0,25 ^{ns}	0,28 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,66*	-

¹NN – número de nódulos por planta; MSN – massa seca de nódulos por planta; MSP – massa seca de parte aérea; NV – número de vagens por planta; MMG – massa de mil grãos; PG – produtividade de grãos; PB – teor de proteína bruta; OLEO - teor de óleo. *Correlação significativa e ^{ns}não significativa a 5 % de probabilidade de erro.

Para a variável PG houve efeito significativo para as doses de S nos experimentos conduzidos na safra 2017/2018 (Tabela 3). Houve ajuste linear crescente em ambos

experimentos, indicando que a dose de 60 kg ha⁻¹ de S resultou na maior PG (Figura 2F e 3D). Houve um incremento de 355 kg ha⁻¹ para o experimento de Santa Maria (4467 – 4822 kg ha⁻¹) e de 364 kg ha⁻¹ para o experimento de Augusto Pestana (3800 – 4164 kg ha⁻¹), representando 7,9 % e 9,5 % a mais na PG respectivamente. O incremento na PG foi de 5,91 e 6,06 kg de grãos para cada kg de S aplicado para os experimentos de Santa Maria e Augusto Pestana respectivamente. Conforme observado na análise de correlação, para o experimento de Augusto Pestana na safra 2017/2018 houve correlação positiva de 0,41 da MSN com a PG (Tabela 4). Com isso, pode-se dizer que o aumento no NN (Figura 3A) que teve correlação positiva com a MSN esta associado ao aumento da PG.

Já para os experimentos conduzidos na safra 2018/2019 não houve efeito dos fatores avaliados sobre a PG, a média de produtividade para Santa Maria e Augusto Pestana foi de 4480 kg ha⁻¹ e 3799 kg ha⁻¹ respectivamente (Tabela 3). Conforme análises de solo, para a safra 2018/2019 em nenhum dos tratamentos com S o teor de SO₄⁻² esteve acima do limite crítico para a cultura da soja (Tabela 2). Possivelmente o excesso de chuvas (Figura 1B) após a aplicação de S-elementar acarretou na lixiviação de SO₄⁻² para camadas de solo abaixo da zona abrangência do sistema radicular, isso ocorre devido a fraca energia de ligação deste ânion aos minerais do solo. Este processo é agravado em solos com baixo teor de argila, bem como pela aplicação de calcário e de fertilizantes fosfatados na camada superficial (CRUSCIOL et al., 2012). Isso ocorre devido a maior energia de ligação entre fosfatos e minerais, e com a aplicação de calcário ocorre precipitação de óxidos de ferro e alumínio, e o OH⁻ ocupa os sítios de adsorção do sulfato. Assim, o acúmulo de sulfato em camadas mais profundas ocorre parcialmente devido a redução do pH do solo em profundidade (BISSANI, 2008).

Os resultados corroboram com os encontrados por Lopes et al. (2017), ao avaliar fontes e doses de S verificaram que houve incremento na produtividade de grãos de soja, com a MET variando entre 66,2 kg ha⁻¹, 91,0 kg ha⁻¹ e 31,6 kg ha⁻¹ de S para superfosfato simples, gesso agrícola e S-elementar respectivamente. Do mesmo modo, Getachew et al. (2017) obtiveram aumento de até 28,8 % na produtividade de grãos com a aplicação de 30 kg de S

ha⁻¹. Porém, os resultados com a utilização de S-elementar na cultura da soja nem sempre são positivos, Broch et al. (2011) avaliando fontes de S observaram que quando o S foi fornecido na forma de S-elementar na dose de 40 kg ha⁻¹ a produtividade de grãos de soja foi inferior ao fornecimento de S na forma de SO₄⁻² via superfosfato simples e gesso agrícola. O benefício da utilização de S depende da fonte utilizada e das condições ambientais, pois para ser aproveitado pelas plantas o S-elementar precisa passar por oxidações até SO₄⁻², para então tornar-se disponível às plantas (HOROWITZ; MEURER, 2006).

Apesar de haver incremento na nodulação com a utilização da coinoculação no experimento de Santa Maria, isso não influenciou na PG. Possivelmente o NN e a MSN foram suficientes para produzir e suprir adequadamente a demanda de N pelas plantas, visto que em ambos os experimentos o NN e a MSN atingiram valores considerados adequados para manutenção da produtividade da soja (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Qualidade de grãos

Na safra 2017/2018 no experimento de Santa Maria o teor de PB na massa de grãos teve ajuste quadrático para a testemunha e para a coinoculação, com a MET sendo obtida com a aplicação de 27 kg de S ha⁻¹ para a coinoculação chegando a 34,3 % de PB, enquanto a testemunha teve sua MET aos 33 kg de S ha⁻¹ com 33,3 % de proteína nos grãos (Figura 2G). A inoculação teve ajuste linear crescente com 33,3 % de proteína com a aplicação de 60 kg de S ha⁻¹. Observou-se o incremento de um ponto percentual na PB com a utilização da coinoculação. Além disso, em relação à testemunha este tratamento necessitou de 6 kg de S ha⁻¹ a menos para atingir maior percentual de proteína. No experimento de Augusto Pestana houve interação, onde a inoculação com *Bradyrhizobium* foi superior à testemunha e a coinoculação na faixa entre 8 e 42 kg de S ha⁻¹, com redução em doses superiores (Figura 3E). A redução no teor de proteína nas doses mais elevadas pode estar relacionada à maior PG nestas doses, visto que existe uma correlação negativa entre produtividade e teor de proteína na massa de grãos (KRISHNAN; JEZ, 2018).

O maior acúmulo de PB nos grãos para a coinoculação na dose referida pode estar associado a maior MSN neste tratamento, visto que houve correlação positiva de 0,46 entre as variáveis MSN e PB (Tabela 4). Além disso, a disponibilidade adequada de SO_4^{2-} possibilita maior atividade da enzima nitrogenase, devido a maior produção de leghemoglobina e de ferredoxina, beneficiando a FBN (VARIN et al., 2010). Getachew et al., (2017) verificaram variação significativa de 31,3 % para 33,5 % no teor de proteína nos grãos quando utilizaram S na dose de 40 kg ha^{-1} , indicando aumento de 7 %. Além disso, ao avaliar estirpes de *Rhizobium* também foram obtidas diferenças significativas para o teor de proteína. Cazzato et al., (2012) também obtiveram aumento no teor de proteína nos grãos de tremçoço (*Lupinus albus* L.) passando de 30,6 % para 32,4 % com a aplicação de 30 kg S ha^{-1} .

Para a safra 2018/2019 no experimento de Santa Maria a coinoculação com 33,68 % de PB foi superior a inoculação com 33,25 % e a testemunha com 33,19 % de PB (Figura 4E). Em relação a aplicação de S, neste experimento o melhor resultado foi obtido com a aplicação de 60 kg ha^{-1} , obtendo-se 33,44 % de PB contra 33,16 % do tratamento na dose zero (Figura 4F). No experimento de Augusto Pestana houve interação entre os tratamentos, a coinoculação foi o tratamento que não apresentou ajuste de nenhuma equação, e foi o tratamento com a menor média, com 32,56 % de PB (Figura 5D). A testemunha não diferiu da inoculação, e foi superior a coinoculação até a dose de 25 kg S ha^{-1} .

Com excessão do experimento de Augusto Pestana na safra 2018/2019, observa-se que os tratamentos que receberam a coinoculação e a aplicação de S proporcionaram maior nodulação das plantas, e possivelmente maior atividade dos nódulos, resultando assim em maior FBN e acúmulo de N que proporcionou incremento na PB dos grãos, resultando em maior qualidade dos mesmos.

Para o teor de óleo houve interação entre os tratamentos para ambos experimentos na safra 2017/2018, porém com pouca variação entre os mesmos. No experimento de Santa Maria o tratamento que produziu maior teor de óleo foi a inoculação com 20,3 % de óleo, seguido de valores ligeiramente inferiores da coinoculação e da testemunha com 19,7 % e 19,6 % de óleo respectivamente (Figura 2H). Para o experimento de Augusto Pestana apenas a

testemunha e a coinoculação foram significativos, apresentando em seu ponto de MET 20 % de óleo para ambos os tratamentos, porém para a testemunha este valor foi aos 46 kg S ha⁻¹ e para a coinoculação apenas na maior dose avaliada (Figura 3F).

Na safra 2018/2019 observou-se interação no experimento de Santa Maria, com os melhores resultados observados para o tratamento testemunha, que foi superior a inoculação e coinoculação (Figura 4D). Estes resultados reforçam a relação inversa entre teor de óleo e proteína bruta, evidenciado pela correlação negativa entre as variáveis PB e OLEO de todos os experimentos conduzidos (Tabela 4). Nesta mesma safra para o experimento de Augusto Pestana houve ajuste linear crescente, obtendo-se o maior teor de óleo na dose de 60 kg de S ha⁻¹ (Figura 5E). Para os tipos de inoculação observou-se resultados superiores para a inoculação e coinoculação que foram superiores à testemunha (Figura 5F).

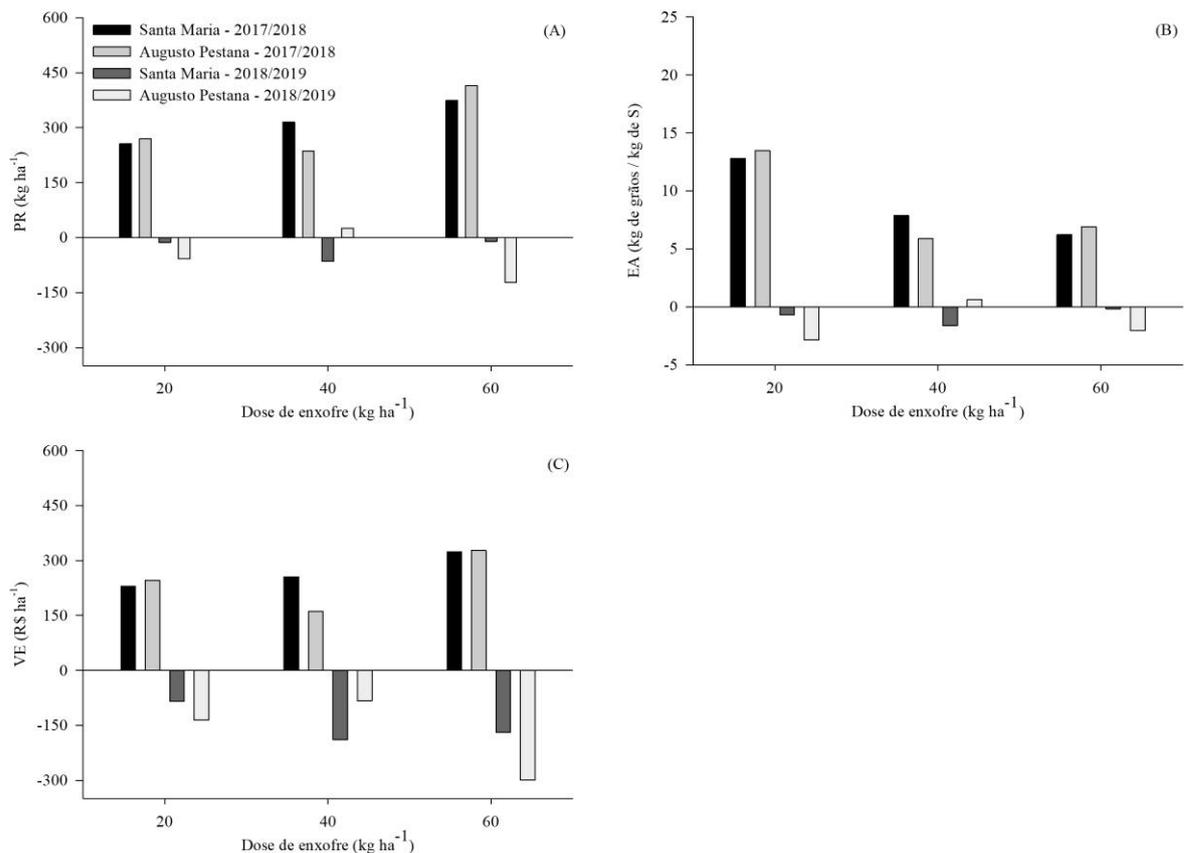
De acordo com Pipolo, Sinclair e Camara (2004), o melhoramento de plantas prioriza a obtenção de cultivares mais produtivas, associadas a resistência à doenças, isso acarreta em redução no teor de proteína nos grãos, devido a correlação negativa entre produtividade e concentração de proteína nos grãos. Além disso, não existe incentivo econômico para a utilização de cultivares com maior teor proteico, visto que produtores são remunerados apenas pela quantidade de grãos produzidos. Porém, a qualidade é influenciada também pelo manejo da cultura, sendo possível aumentar o teor de proteína pela maximização da assimilação de N, principalmente pela FBN.

Produtividade relativa, eficiência agronômica e viabilidade econômica

As análises de produtividade relativa (PR), eficiência agronômica (EA), e viabilidade econômica (VE) foram estimadas com base na produtividade média dos tratamentos na dose zero de cada experimento. As produtividades que serviram como referência para estas análises foram de 4408 kg ha⁻¹ e 3752 kg ha⁻¹ (Santa Maria e Augusto Pestana, safra 2017/2018), e 4502 kg ha⁻¹ e 3838 kg ha⁻¹ (Santa Maria e Augusto Pestana, safra 2018/2019). Os valores da VE (Figura 6C) são referentes a comercialização dos grãos de soja (R\$ 70,00 por saca de

60 kg de grãos) juntamente com os custos para a aplicação das doses de S (R\$ 2,22 por kg de nutriente + custo de aplicação).

Figura 6 – Produtividade relativa (A), eficiência agrônômica (B), e viabilidade econômica (C) da comercialização de grãos de soja, em função da aplicação de doses de enxofre (20, 40 e 60 kg ha⁻¹), tendo como referência a dose zero. Santa Maria e Augusto Pestana, safras 2017/2018 e 2018/2019.



A PR (Figura 6A) representa o ganho obtido com a aplicação das doses de S, conforme verificado para a PG houve incremento na PG apenas na safra 2017/2018 nos experimentos de Santa Maria e Augusto Pestana. Com base na PR avaliou-se a EA (Figura 6B), que representa o volume de grãos de soja produzidos com a aplicação de uma unidade de nutriente. A EA foi positiva para a safra 2017/2018, indicando maior EA para a dose de 20 kg ha⁻¹, obtendo-se em média 13 kg de grãos para cada kg de S aplicado, contra apenas 6 kg de grãos para cada kg de S aplicado nas doses 40 e 60 kg. A maior EA resultou em VE da aplicação de S apenas para a safra 2017/2018, obtendo-se o maior retorno na dose de 60 kg ha⁻¹ (Figura 6C).

Para a safra 2018/2019 a VE foi negativa (Figura 6C), isso deve-se a falta de incremento produtivo pela aplicação do S, além de apresentar redução não significativa na produtividade em algumas doses aplicadas (Figura 6A). Os resultados indicam que a aplicação de S acarretou em prejuízo ao produtor, pode-se atribuir isso a elevada precipitação pluvial observada no início do ciclo de cultivo (Figura 1B), resultando em rápida conversão e lixiviação do SO_4^{2-} no solo, conforme verificado pela avaliação do teor de SO_4^{2-} no solo ao longo do ciclo de cultivo (Tabela 2).

CONCLUSÕES

A aplicação de enxofre elementar em doses entre 20 e 40 kg ha⁻¹ promove a nodulação, o acúmulo de massa seca de plantas, a produtividade e a qualidade de grãos de soja, além de beneficiar a nodulação quando combinado com a coinoculação de *Bradyrhizobium* ssp. e *Azospirillum brasilense*.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2014.

ALVAREZ, J. W. R. **Disponibilidade e resposta de culturas ao enxofre em solos do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria. 84p.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Publicações ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Disponível em: < http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/anuario-estatistico/2018/anuario_2018.pdf>. Acesso em 22 abr. 2019.

ASHRAF, M.A.; RASOOL, M.; MIRZA, M. S. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Research**, v. 5, p. 348–355, 2011.

ARDAKANI, M.R.; MAZAHERI, D. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces sp.*, *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.17, p.181–192, 2011.

BECANA, M.; WIENKOOP, S.; MATAMOROS, M. A. Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-10, 2018.

BENINTENDE, S. et al. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. **Agriscientia**, v. 27, n. 2, p. 71-77, 2010.

BISSANI, C. A. et al. Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas. **Porto Alegre: Editora Metrópole**, 2008.

BROCH, D. L. et al. Produtividade da soja no cerrado influenciada pelas fontes de enxofre. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 791-796, 2011.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CAZZATO, E. et al. Influence of S application on protein quality, fatty acid composition and nitrogen fixation of white lupin (*Lupinus albus* L.). **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 963-969, 2012.

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

COHEN, A. C. et al. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária**. Safra 2018/2019, v. 6, 2018.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre, SBCS, 376p, 2016.

CRUSCIOL, G. Fertilidade do solo e nutrição de plantas no sistema plantio direto. **AEACG/Inpag: Ponta Grossa**, 2012.

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, p. 1327-1334, 2019.

EIA. Energy Information Administration. **Monthly Biodiesel Production Report**. Disponível em: <<https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/biodiesel.pdf>>. Acesso em 22 abr. 2019.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Brasília, 2018. 356p.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 1, p. 6-16, 1998.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Special Report, 80).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

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.

FOX, R.L.; HUE, N.V.; PARRA, A.J. A turbidimetric method for determining phosphate-extractable sulfates in tropical soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.18, p.343-357, 1987.

FUKAMI., J. et al. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 1191, 2018.

GETACHEW, Z.; ABERA, G.; BEYENE, S. Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrients uptake and protein quality of soybean (*Glycine max* L.) varieties on Nitisols of Assosa area, Western Ethiopia. **African Journal of Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 123-132, 2017.

- HOROWITZ, N.; MEURER, E. J. Relação entre atributos de solos e oxidação de enxofre elementar em quarenta e duas amostras de solos do Brasil. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- HOROWITZ, N.; MEURER, E. J. Oxidação do enxofre elementar em solos tropicais. **Ciência Rural**, v. 36, n. 03, p. 822-828, 2006.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 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.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- KARIMIZARCHI, M. et al. Elemental sulphur application effects on nutrient availability and sweet maize (*Zea mays* L.) Response in a high pH soil of Malaysia. **Malaysian Journal of Soil Science**, v. 18, p. 75-86, 2014.
- KRISHNAN, H. B.; JEZ, J. M. The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. **Plant Science**, v. 272, p. 14-21, 2018.
- JEMAL, A.; MOON, Y. S.; ABDIN, M. Z. Enzyme activity assessment of peanut (*Arachis hypogea* L.) under slow-release S fertilization. **Australian Journal Crop Science**, v. 4, n. 3, p. 169-174, 2010.
- LOPES, L. O. et al. Effect of sources and doses of sulfate on soybean crop. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 3, p. 296-302, 2017.
- MAHMOUD, A. A. et al. Effect of six decades of selective breeding on soybean protein composition and quality: a biochemical and molecular analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3916-3922, 2006.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. 2019. Acesso em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/index.htm>>

PERINI, L. J. et al. Componentes da produção em cultivares de soja com crescimento determinado e indeterminado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2531-2544, 2012.

PIPOLO, A. E.; SINCLAIR, T. R.; CAMARA, G. M.S. Effects of temperature on oil and protein concentration in soybean seeds cultured in vitro. **Annals of applied biology**, v. 144, n. 1, p. 71-76, 2004.

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rizobia: de saprófitas a endossimbiontes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 291, 2018.

REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 41. Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2016/2017 e 2017/2018. 1 ed. Passo Fundo: UPF, 2016. 128p.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Aturwissenschaften**, v. 91, p. 552–555, 2004.

SCHERER, H. W. et al. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 7, p. 909-916, 2008.

SCHNEIDER, S. et al. Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, p. 1180-1189, 2019.

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

UDVARDI, M. et al. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 781-805, 2013.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Keys to soil taxonomy**. 12 ed. 372 p, 2014.

VARIN, S. et al. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)?. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 225-234, 2009.

WANG, S. et al. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1250–1258, 2009.

4 ARTIGO 2

Inoculação e coinoculação associadas ao uso de enxofre aumentam a qualidade fisiológica de sementes e reduzem o estresse oxidativo em plântulas de soja

Resumo

A utilização de sementes com qualidade fisiológica é essencial para o estabelecimento da cultura da soja, e pode ser influenciada pelo estado nutricional das plantas genitoras. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja oriundas de plantas genitoras submetidas a inoculação e a coinoculação, associadas à doses de enxofre (S). Foram conduzidos dois experimentos durante a safra agrícola 2017/2018 nos municípios de Santa Maria e Augusto Pestana, Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Utilizou-se a cultivar Nidera 5959 IPRO em ambos experimentos. A campo os tratamentos foram organizados em um fatorial 3 x 4, combinando três tipos de inoculações [Testemunha (não inoculado), Inoculação com *Bradyrhizobium* spp., e Coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. + *Azospirillum brasilense*] com quatro doses de S (0, 20, 40 e 60 kg S ha⁻¹). Após a colheita as sementes foram armazenadas por seis meses e então avaliadas quanto a qualidade fisiológica pelos testes de germinação e vigor. As sementes do experimento de Santa Maria foram submetidas ao teste padrão de germinação, e posteriormente as plântulas foram seccionadas em raiz e parte aérea, e avaliadas quanto ao conteúdo de peróxido de hidrogênio, enzimas antioxidantes, e pigmentos fotossintéticos. A adubação com S combinada com a coinoculação de plantas genitoras possibilita a expressão do vigor de sementes destas plantas. Além disso, a inoculação e a coinoculação permitem a obtenção de sementes com maior percentual de germinação.

Palavras-chave: Enxofre Elementar. Germinação. *Glycine max*. Nutrição. Vigor.

Introdução

Diante da importância econômica e social da soja (*Glycine max.* L. Merrill) no mundo, o uso de sementes com atributos de qualidade física, sanitária, genética e fisiológica é indispensável para garantir o estabelecimento da cultura no campo, e permitir a expressão do potencial produtivo (Carvalho e Nakagawa, 2012; Brzezinski *et al.*, 2017). Dentre os atributos de qualidade fisiológica, o vigor de sementes é fundamental para o estabelecimento rápido e uniforme das plântulas, principalmente sob condições de ambiente desfavorável durante o período de germinação e emergência (Marcos Filho, 2015b).

A disponibilidade de nutrientes à planta genitora influencia na qualidade fisiológica de sementes de soja (Guerra *et al.*, 2006). Isso ocorre devido as alterações no acúmulo de reservas, dentre proteínas, carboidratos, lipídios, e minerais nas sementes (Marcos Filho, 2015a). O equilíbrio nutricional é essencial na formação do embrião e dos cotilédones (Carvalho and Nakagawa, 2012). No início da germinação as plântulas utilizam reservas acumuladas no embrião como fonte de energia. Posteriormente, a manutenção das plântulas se dá pela mobilização das reservas dos tecidos de armazenamento até os pontos de crescimento. Assim, as reservas são importantes até o momento que a plântula passa a viver autotroficamente (Carvalho and Nakagawa, 2012; Marcos Filho, 2015a). Deste modo, a disponibilidade de nutrientes às plantas genitoras é importante durante todo o período de cultivo, visto que isso influenciará no acúmulo de nutrientes na parte aérea e posterior transferência e acúmulo destes nas sementes (Getachew *et al.*, 2017).

No Brasil a recomendação de calagem e adubação de áreas destinadas à produção de sementes de soja é realizada baseando-se nos níveis críticos utilizados para áreas de produção de grãos (CQFS, 2016). No entanto, os solos estão sujeitos à deficiência de enxofre (S), sendo que entre 90 % e 95 % deste nutriente encontra-se na forma orgânica, e sua disponibilidade pode ser limitada, principalmente em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica (MO) (Sutar *et al.*, 2017). Esta deficiência nutricional agrava-se com a remoção do S pelas culturas sem a devida reposição, devido a priorizar-se o uso de fertilizantes contendo

principalmente macronutrientes primários [nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K)] (Jemal *et al.*, 2010). Para o cultivo da soja nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, recomenda-se a aplicação de S quando o nível de sulfato (SO_4^{2-}) no solo estiver abaixo de 10 mg dm^{-3} na camada de 0 a 10 cm de profundidade (CQFS, 2016). Porém, devido à elevada mobilidade do SO_4^{2-} no solo, pode ocorrer indisponibilidade deste nutriente nos estádios de maior demanda da cultura.

O S é um elemento essencial na formação de sementes de soja. Por ser uma leguminosa, a soja produz elevado teor de proteína nas sementes (36 %) (Mahmoud *et al.*, 2006), por isso a planta demanda elevada quantidade de S quando comparada às gramíneas (Jemal *et al.*, 2010). Isso deve-se a participação do nutriente na produção de aminoácidos essenciais como a cisteína e metionina (Krishnan e Jez, 2018). Além disso, é constituinte de ferredoxinas, que são proteínas envolvidas na fotossíntese e na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Becana *et al.*, 2018).

A FBN é o principal meio de fornecimento de N para as plantas de soja. Neste contexto, bactérias do gênero *Bradyrhizobium* formam uma relação simbiótica com a soja. As bactérias atuam assimilando o nitrogênio atmosférico (N_2), disponibilizando este na forma de amônia (NH_3) para as plantas, em troca as plantas disponibilizam os carboidratos necessários às bactérias (Queiroz Rego *et al.*, 2018). As bactérias do gênero *Azospirillum* também estão sendo recomendadas em coinoculação da soja. Estas bactérias beneficiam as culturas por um conjunto de mecanismos, dentre eles, a FBN, produção de fitormônios de crescimento, solubilização de fosfatos, tolerância a doenças, e melhorias no aparato fotossintético (Bashan *et al.*, 2014; Cassán *et al.*, 2009; Masciarelli *et al.*, 2014), resultando em incremento na produtividade de grãos (Hungria *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2015).

Neste contexto, o suprimento adequado de S favorece a FBN, pois o S é essencial na formação e atividade da ferredoxina e da nitrogenase, enzimas reponsáveis pelo transporte de elétrons e conversão do N_2 em amônia (NH_3) (Varin *et al.*, 2010). Com isso, tem-se maior disponibilidade de N para as plantas, e conseqüentemente melhorias no metabolismo das mesmas, visto que o N é constituinte de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, fitormônios,

clorofilas e metabólitos secundários (Becana *et al.*, 2018). Possibilitando assim melhorias na qualidade fisiológica de sementes, pois esta é influenciada pela disponibilidade e assimilação de nutrientes (Marcos Filho *et al.*, 2015a).

A adubação com S incrementa a produtividade de grãos (Getachew *et al.*, 2017). Além disso, melhorias na qualidade fisiológica de sementes também são obtidas com a aplicação de S (César *et al.*, 2008). A qualidade fisiológica de sementes de soja é superior quando utilizada a adubação com fósforo, molibdênio e cobalto, contribuindo com a manutenção no vigor e na germinação de sementes, indicando que é possível produzir sementes com qualidade com o manejo adequado da fertilidade do solo (Guerra *et al.*, 2006).

O menor crescimento inicial de plântulas de soja pode estar relacionado ao estresse provocado pela deficiência nutricional. Plantas submetidas a condições estressantes produzem espécies reativas de oxigênio [ERO, do inglês *reactive oxygen species (ROS)*], que são formadas principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos a partir do oxigênio molecular (O_2) utilizado na respiração celular (Karuppanapandian *et al.*, 2011). As ERO atuam em resposta a situações de estresse, influenciando na expressão de genes do metabolismo e das vias de transdução de sinais. Porém, quando acumulam-se nas células, podem reagir com moléculas biológicas causando danos irreversíveis e levar a morte celular, devido ao estresse oxidativo extremo (Barbosa *et al.*, 2014). Como forma de evitar o acúmulo de ERO e do estresse oxidativo, as plantas possuem mecanismos de defesa antioxidante, formado por agentes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase, glutathiona redutase, peroxidases (POD), catalase e polifenoloxidase (Mittler, 2002).

Objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica de sementes de plantas genitoras inoculadas, coinoculadas e associadas à aplicação de doses de S fornecido via enxofre elementar (S-elementar).

Material e métodos

Descrição dos locais de obtenção das sementes

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas. A primeira etapa foi realizada em dois locais, sendo conduzidos dois experimentos de campo na safra 2017/2018. O primeiro experimento (Exp 1) foi realizado no Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, situado no município de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil (29°71'S, 53°70'W, altitude de 116 metros). O solo da região é classificado como *Argissolo Vermelho Distrófico Arênico* (EMBRAPA, 2018) [*Ultisol* (USDA, 2014)]. O segundo experimento (Exp 2) foi conduzido no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR), vinculado ao Departamento de Estudos Agrários (DEAg), da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), situado no município de Augusto Pestana, RS, Brasil (28°43'S, 54°00'W, altitude de 448 metros), em um solo classificado como *Latossolo Vermelho Distroférrico típico* (EMBRAPA, 2018) [*Oxisol* (USDA, 2014)]. A precipitação pluvial durante o período de condução dos experimentos foi de 526 mm para Santa Maria, e 660 mm para Augusto Pestana.

Antes da aplicação dos tratamentos foi realizada a amostragem do solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm para determinação dos atributos químicos para posterior interpretação e recomendação de adubação (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química do solo das áreas experimentais de Santa Maria (Exp 1) e Augusto Pestana (Exp 2) antes da instalação dos experimentos. Safra 2017/2018.

Local	Camada ¹ cm	ARG %	pH _{H₂O} 1:1	MO %	P --- mg dm ⁻³ ---	K mg dm ⁻³	S ---	Ca	Mg	Al	CTC _{pH 7} ----- cmol _c dm ⁻³ -----
Santa Maria 2017/2018	0 – 10	18,0	4,7	2,0	37,2	108,0	16,8	2,2	0,6	1,0	10,0
	10 – 20	21,0	4,7	1,2	18,4	64,0	7,9	1,8	0,5	1,1	10,2
Augusto Pestana 2017/2018	0 – 10	56,0	5,1	2,9	49,3	248,0	6,7	4,1	1,3	0,5	10,4
	10 – 20	64,0	5,1	2,1	28,1	224,0	9,8	3,6	1,2	0,5	9,7

¹Camada – camada de solo coletada (cm); ARG – argila (%; m/v); pH (água, 1:1); MO – matéria orgânica (%; m/v); P – fósforo (P-Mehlich, mg dm⁻³); K – potássio (mg dm⁻³); S – SO₄⁻² (mg dm⁻³); Ca – cálcio (cmol_c dm⁻³); Mg – magnésio (cmol_c dm⁻³); Al – alumínio (cmol_c dm⁻³); CTC – capacidade de troca de cátions (CTC_{pH 7}, cmol_c dm⁻³).

Descrição dos tratamentos de campo

Os experimentos de campo foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, em um fatorial 3 x 4, com quatro repetições. Os tratamentos foram formados por três tipos de inoculação [Testemunha (não inoculado), Inoculação (*Bradyrhizobium* spp.), e Coinoculação (*Bradyrhizobium* spp. + *Azospirillum brasilense*)], e quatro doses de S fornecido via S-elementar (0, 20, 40 e 60 kg S ha⁻¹).

A inoculação com *Bradyrhizobium* foi realizada com produto comercial (TotalNitro_{max}[®], Total Biotecnologia) de formulação líquida com garantias de 7 x 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹ de produto comercial) de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 15 (semia 5079) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CPAC 7 (semia 5080), na dose de dois mL por quilograma (kg) de sementes. Para o tratamento com *Azospirillum* foi utilizado produto comercial (AzoTotal_{max}[®], Total Biotecnologia) com formulação líquida contendo *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com garantias de 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹, na dose de dois mL kg⁻¹ de sementes. A inoculação foi realizada 30 minutos antes da semeadura, utilizando seis mL de calda kg⁻¹ de sementes, que foi preparada com a mistura dos inoculantes e água. A aplicação do S foi realizada 20 dias antes da semeadura (DAS) em aplicação a lanço, com um produto formulado contendo 90 % de S-elementar (Sulfurgran[®], Produquímica).

Manejo das áreas de produção de sementes

A semeadura foi realizada com uma semeadora adubadora nos dias 30/11/2017 e 01/12/2017 em Santa Maria (324 mil plantas ha⁻¹) e Augusto Pestana (315 mil plantas ha⁻¹) respectivamente. Foi utilizada a cultivar Nidera 5959 IPRO, do grupo de maturação relativa 5.9, e tipo de crescimento indeterminado, categoria de sementes C1. O tratamento fitossanitário das sementes (TS) foi realizado com produto comercial contendo fungicida e

inseticida formulado a base de *piraclostrobina* + *tiofanato metílico* + *fipronil* (Standak Top[®], 0,05 - 0,45 - 0,5 g i.a. kg⁻¹ de sementes), realizado 24 horas antes da inoculação das sementes.

A adubação foi realizada via sulco de semeadura com a mistura de superfosfato triplo (46 %, P₂O₅) e cloreto de potássio (60 %, K₂O), que foi realizada manualmente na proporção 1:1, originando a formulação 00-23-30 (N-P₂O₅-K₂O). As doses foram ajustadas para expectativa de produtividade de cinco toneladas de sementes por hectare para ambos experimentos (CQFS, 2016). Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura da soja, visando a produção de sementes (Reunião...2016).

Colheita, secagem, armazenamento e caracterização dos lotes de sementes

No estágio fenológico R8 (Fehr e Caviness, 1978) as plantas foram monitoradas para que a colheita fosse realizada com umidade dos grãos próxima a 13 %. As plantas foram colhidas com o auxílio de uma motosegadeira, posteriormente trilhadas com uma trilhadora, e limpas com uma classificadora de sementes. Após limpas e classificadas, as sementes das quatro repetições foram homogeneizadas formando uma amostra (1000 g), então foi determinada a massa de 1000 sementes na base seca (13 %) (Tabela 2). Também foi determinado o teor de proteína bruta na massa de sementes, analisado por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (Tabela 2). Estas amostras foram acondicionadas em sacos de papel kraft, e armazenadas sob temperatura de 15 °C e umidade relativa do ar (UR) de 55 % pelo período de seis meses, após este período as sementes foram submetidas aos testes de qualidade fisiológica, compondo a segunda etapa dos experimentos.

Tabela 2. Caracterização dos lotes de sementes obtidos do campo. Santa Maria e Augusto Pestana, RS. Safra 2017/2018.

Tipo de Inoculação	Santa Maria (Exp 1)				Augusto Pestana (Exp 2)			
	Dose de S (kg ha ⁻¹)				Dose de S (kg ha ⁻¹)			
	0	20	40	60	0	20	40	60
<u>Percentual de umidade (%)</u>								
Testemunha	10,77	11,04	11,13	11,52	11,03	10,85	10,97	10,87
Inoculação	11,19	11,19	11,27	11,06	11,35	11,19	10,78	11,40
Coinoculação	11,21	11,34	11,11	11,42	10,99	11,23	11,11	10,80
<u>Massa de 1000 sementes (g)</u>								
Testemunha	186,67	186,39	190,27	193,65	156,05	152,13	152,42	150,64
Inoculação	193,78	191,43	188,02	197,18	153,46	153,11	148,10	152,67
Coinoculação	197,55	195,59	190,15	190,65	150,38	152,37	148,25	150,75
<u>Teor de proteína (%)</u>								
Testemunha	32,34	33,51	32,64	32,78	33,31	33,28	32,45	33,37
Inoculação	32,61	32,61	32,91	33,50	32,96	33,69	32,73	32,12
Coinoculação	33,52	33,09	35,32	32,36	32,83	32,49	32,52	31,75

Variáveis analisadas

A segunda etapa dos experimentos foi realizada no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes do Departamento de Fitotecnia, e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, localizados em Santa Maria, RS, Brasil, em outubro de 2018. Foram utilizadas sementes colhidas na safra 2017/2018. Nesta etapa utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em um fatorial 3 x 4, com quatro repetições, submetendo as sementes aos testes descritos.

Primeira contagem de plântulas (PC, %), e teste padrão de germinação (G, %): foram semeadas quatro repetições de 50 sementes uniformemente distribuídas entre três folhas de papel toalha (germitest) umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Destas folhas de papel toalha foram confeccionados rolos, que foram acondicionados em sacos plásticos fechados e levados ao germinador do tipo Biochemical oxygen demand (BOD), e foram mantidos na posição vertical, sob temperatura de 25 °C pelo período de oito dias, com fotoperíodo 12/12 h (claro, escuro). Para avaliação da PC foi

realizada a contagem aos cinco dias após a semeadura (DAS), e para avaliação da germinação foi realizada a contagem aos oito DAS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais (Brasil, 2009).

Comprimento de parte aérea (CPA, cm plântula⁻¹) e *comprimento de raiz* (CR, cm plântula⁻¹): foram utilizadas 10 plântulas normais oriundas do teste de PC, estas foram medidas com régua milimétrica (raiz primária e hipocótilo), expressando os resultados em centímetros por plântula (Nakagawa, 1999).

Massa seca de plântula (MSP, mg plântula⁻¹): após avaliação do comprimento de raiz primária e hipocótilo, foram removidos os cotilédones e as plântulas foram alocadas em sacos de papel, e levadas a estufa de circulação de ar forçado pelo período de 48 horas a uma temperatura constante de 65°C, então aferida a massa, e os resultados expressos em miligrama por plântula (Nakagawa, 1999).

Envelhecimento acelerado (EA, %): foram utilizadas caixas de gerbox (A x L x P - 11 x 11 x 3 cm) com uma tela colocada na posição horizontal no centro de caixas. Distribui-se uma camada única de sementes tomando toda a superfície da tela. No fundo das caixas foi adicionado 40 ml de água destilada afim de manter a umidade relativa em aproximadamente 100 %. Em seguida as caixas foram tampadas, vedadas e então levadas à estufa com circulação de ar forçada e mantidas na temperatura de 41 °C pelo período de 48 horas (Marcos Filho *et al.*, 2001b). Após este procedimento as sementes foram colocadas para germinar pelo mesmo procedimento utilizado no teste padrão de germinação, sendo os valores expressos em plântulas normais no quinto dia após instalação do teste (Brasil, 2009).

Condutividade elétrica (CE, $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$): foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes previamente pesadas em balança de precisão (0,001 g), estas foram colocadas em copos plásticos (200 mL), e em seguida foram adicionados 75 mL de água destilada em cada copo. Os copos foram levados a BOD e mantidos pelo período de 24 horas com luz constante e temperatura de 25 °C (Krzyzanowski *et al.*, 1999). Após o período de embebição das sementes foi realizada a leitura da CE da solução com o auxílio de um condutímetro, e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

As sementes do Exp 1 foram utilizadas em análises bioquímicas. Para estas análises as sementes foram submetidas ao teste padrão de germinação, semeando quatro repetições de 50 sementes por rolo de papel (Brasil, 2009). Aos oito DAS as plântulas foram seccionadas em raiz e parte aérea excluindo-se os cotilédones e congeladas imediatamente em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Destas amostras determinou-se o conteúdo de peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes. Além destas, na parte aérea também foi determinada a quantidade de clorofila total e carotenóides, conforme metodologias assim descritas.

Conteúdo de *Peróxido de hidrogênio* (H_2O_2 , $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca): foi determinado na parte aérea e nas raízes das plântulas, que foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido, homogeneizadas em ácido tricloroacético (0,1%, w/v), na sequência sendo centrifugadas (12,000 x g, 15 min, 4°C). Uma fração do sobrenadante foi removida adicionando-se um tampão de fosfato de potássio (10 mM, pH 7) acrescido de iodeto de potássio (1 M). O conteúdo de H_2O_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria seca) do sobrenadante foi determinado comparando-se a absorbância no comprimento de 390 nm com uma curva de calibração padrão (Loreto e Velikova, 2001).

Para as análises enzimáticas foram utilizadas amostras de raízes e da parte aérea das plântulas, onde estas foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo que 0,5 g de amostra foi homogeneizada em 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2 % (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 xg por 20 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas (Zhu *et al.*, 2004) e concentração de proteínas (Bradford, 1976).

Guaiacol peroxidase (POD, U mg^{-1} proteína): a atividade desta enzima foi determinada pela metodologia de 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 H_2O_2 (3 mM). Após homogeneização, foi adicionado 50 μL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida pela oxidação do guaiacol a tetraguaiacol por meio do 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⁻¹ cm⁻¹.

Superóxido dismutase [SOD, unidades de enzima (U) mg⁻¹ proteína]: foi utilizado o método espectrofotométrico (Giannopolitis e Ries, 1977), em uma solução contendo fosfato de potássio (50 mM, pH 7.8), metionina (13 mM), riboflavina (2 µM), nitroblue tetrazólio (NBT) (75 µM), tetraácido de etilenodiamina (0.1 mM) e extrato enzimático (100 µL). A produção fotoquímica de azul de formozana oriunda do nitroblue tetrazólio foi monitorada pelo acréscimo na absorbância de 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução de NBT em 50 % (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Clorofilas e carotenóides (mg g⁻¹ FW): a extração dos pigmentos fotossintéticos se deu por meio da metodologia proposta por Hiscox e Israelstan (1979) e estimando-se pela equação de Lichtenthaler (1987). Amostras de folhas (0,05 g) foram incubadas a 65 °C com dimetilsulfóxido (DMSO) até a extração completa dos pigmentos. As absorbâncias da solução foram medidas em espectrofotômetro (Celm E-205D) a 663, 645 para as clorofilas *a* e *b* respectivamente, e 470 nm para os carotenóides.

Análise estatística

Os dados foram submetidos às pressuposições do modelo matemático (Steel *et al.*, 1997), posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de F. Quando significativos foi realizada análise de regressão para as doses de S, e teste de comparação de médias de Scott-Knott a 5 % de probabilidade de erro para os tipos de inoculações, observando as interações. As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Sisvar® (Ferreira, 2011).

Resultados e discussões

Qualidade fisiológica de sementes

Para as variáveis de qualidade fisiológica de sementes no Exp 1 houve interação entre os fatores para o teste de EA. O teste de PC apresentou efeito significativo para os fatores principais inoculações e doses de S, já para G e CE apenas o fator principal inoculações foi significativo, e para o teste de CPA houve significância apenas para o fator principal doses de S (Tabela 3). No Exp 2 foi verificada interação entre os fatores para as variáveis CPA e EA. Em relação as inoculações houve efeito significativo para os testes de PC e CR (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para os experimentos com sementes de Santa Maria (Exp 1) e Augusto Pestana (Exp 2).

Exp 1								
FV ¹	GL ³	PC ⁴	G	CPA	CR	MSP	CE	EA
Inoculação (INO)	2	343,58*	335,08*	0,21 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,00 ^{ns}	157,33*	402,25*
Enxofre (S)	3	224,30*	39,63 ^{ns}	1,25*	2,37 ^{ns}	0,00 ^{ns}	17,20 ^{ns}	132,22*
INO x S	6	134,47 ^{ns}	42,63 ^{ns}	0,32 ^{ns}	3,30 ^{ns}	0,00 ^{ns}	37,85 ^{ns}	140,80*
Erro	36	77,86	41,47	0,34	0,87	0,00	31,07	31,05
Média	-	75,79	88,45	3,57	5,65	18,00	35,51	73,5
CV (%) ²	-	11,64	7,28	16,52	16,54	13,77	15,7	7,58
Exp 2								
Inoculação (INO)	2	289,33*	63,08 ^{ns}	0,72*	4,18*	0,00 ^{ns}	120,42 ^{ns}	190,33*
Enxofre (S)	3	13,11 ^{ns}	8,30 ^{ns}	1,00*	0,12 ^{ns}	0,00 ^{ns}	247,34 ^{ns}	258,88*
INO x S	6	115,77 ^{ns}	91,97 ^{ns}	0,46*	0,30 ^{ns}	0,00 ^{ns}	189,70 ^{ns}	479,88*
Erro	36	66,83	50,41	0,16	0,49	0,00	122,31	31,83
Média	-	59,83	70,79	3,75	5,44	16,00	61,91	28,83
CV (%)	-	13,66	10,03	10,9	18,87	12,2	17,86	19,57

¹Fonte de variação (FV), ²coeficiente de variação (CV%), ³graus de liberdade do erro (GL), ⁴Variáveis explicativas: *primeira contagem* (PC, %), *germinação* (G, %), *comprimento de parte aérea* (CPA, cm plântula⁻¹), *comprimento de raiz* (CR, cm plântula⁻¹), *massa seca de plântula* (MSP, mg plântula⁻¹), *condutividade elétrica* (CE, $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$), e *envelhecimento acelerado* (EA, %). *significativo e ^{ns}não significativo pelo teste de F ($\alpha \leq 0,05$).

Primeira contagem

No Exp 1 pelo teste de PC a inoculação teve 76,1 % e a coinoculação 80,2 % de plântulas normais em contagem realizada aos cinco DAS, possibilitando a obtenção de sementes com potencial fisiológico superior ao tratamento não inoculado que obteve em média 71,0 % (Fig. 1A). Para o Exp 2 os resultados foram semelhantes, com 63,0 % para a inoculação e 61,5 % para coinoculação, sendo superiores a testemunha que teve 55,0 % de plântulas normais (Fig. 2A). As sementes oriundas de plantas genitoras que foram inoculadas e coinoculadas podem ter tido maior concentração de N disponível proveniente da FBN (Getachew *et al.*, 2017). Conseqüentemente houve maior translocação e acúmulo de proteínas nas sementes, e as plântulas originadas destas sementes tiveram maior aporte de proteína para o crescimento do eixo embrionário e formação dos tecidos da plântula (Guerra *et al.*, 2006).

Em relação a aplicação de doses de S houve efeito significativo apenas no Exp 1, sendo obtida a MET na dose de 19,45 kg S ha⁻¹, com 79 % de plântulas normais na PC (Fig. 1B). Pode-se atribuir o maior vigor das plântulas ao maior acúmulo de S nas sementes, e conseqüente aumento na produção de proteínas (Dhage *et al.*, 2014). A redução dos valores da PC observados em doses superiores a MET pode ser devido a menor quantidade de N translocada das folhas para as sementes, devido ao excesso de S disponível (César *et al.*, 2008). A aplicação de doses de S superiores a demanda das plantas pode causar um desequilíbrio na absorção destes nutrientes, promovendo excesso na absorção de S e acarretando em redução no teor de N foliar (Crusciol *et al.*, 2006).

Germinação

No Exp 1 a G seguiu a tendência obtida para o teste de PC, ou seja, a inoculação com 89,7 % e a coinoculação com 92,2 % foram superiores à testemunha com 83,3 % (Fig. 1C). A coinoculação foi 10,6 % superior ao tratamento testemunha, indicando maior potencial

fisiológico de sementes obtidas de plantas que receberam a coinoculação. Em experimento conduzido por Queiroz Rego et al. (2018), a coinoculação além de promover maior produtividade de sementes, permitiu a obtenção de sementes com percentual de germinação 16,0 % superior em relação a testemunha não inoculada. Possivelmente o maior percentual de germinação obtido para a coinoculação está relacionado ao maior acúmulo de nitrogênio nas sementes, proveniente da FBN, que é mais eficiente nestes tratamentos, devido a maior nodulação (Getachew *et al.*, 2017).

Em relação às doses de S não se observou diferença significativa para ambos experimentos, indicando não haver efeito do S sobre a germinação das sementes para ambos experimentos (Tabela 3). César et al. (2008) também não observaram efeito de doses de S via sulfato de amônio sobre a germinação de sementes de feijão, entretanto verificaram efeito do S sobre o vigor das sementes. Deste modo, pode-se dizer que em condições de deficiência de S no solo a planta de soja tende a formar menos sementes, porém mantendo sua capacidade de germinação.

Comprimento de parte aérea

Para a variável CPA no Exp 1 apenas o fator principal doses de S foi significativo, com ajuste de uma equação quadrática, obtendo a MET com a aplicação de 23,51 kg de S ha⁻¹, chegando a 3,87 cm plântula⁻¹ de parte aérea (Fig. 1D). Observa-se redução no CPA quando aplicou-se doses superiores a 40 kg de S ha⁻¹, isso pode ser devido a menor disponibilidade de SO₄⁻², ocasionado pelo efeito tóxico do excesso de S aos microrganismos do solo, causando redução na taxa de oxidação de S-elementar a SO₄⁻² (Horowitz e Meurer, 2006).

No Exp 2 houve interação entre os fatores avaliados, onde inicialmente observou-se redução dos valores para a testemunha e para a coinoculação com o aumento das doses até um ponto de mínima, voltando a subir na maior dose avaliada (Fig. 2B), enquanto para o tratamento com a inoculação houve um ajuste linear crescente, variando de 3,25 cm plântula⁻¹

na dose zero para 3,90 cm plântula⁻¹ na dose de 60 kg S ha⁻¹. César et al. (2008) observaram redução no comprimento de plântula, bem como redução na MSP com o aumento das doses de S aplicadas na cultura do feijão. O aumento da exportação de S pelas plantas eleva também a quantidade de S destinada às sementes (Getachew *et al.*, 2017). Porém, com maior concentração de S nas sementes, Getachew et al. (2017) observaram que houve redução no acúmulo de N nas sementes. Isso pode acarretar em redução no teor de aminoácidos, afetando a qualidade fisiológica das sementes (Crusciol *et al.*, 2006). O maior CPA é um indicativo da maior qualidade fisiológicas das sementes. Sementes vigorosas permitem o estabelecimento de plântulas vigorosas, que tendem a viver autotroficamente antes que plântulas com baixo vigor, favorecendo estas plântulas durante o estabelecimento da cultura (Soltani *et al.*, 2006).

Comprimento de raiz

Para a variável CR não houve efeito significativo para o Exp 1 com média de 5,65 cm plântula⁻¹ (Tabela 3). Já para o Exp 2 foi obtido efeito significativo para o fator inoculação, onde a coinoculação e a inoculação com 5,89 e 5,56 cm por plântula respectivamente, foram superiores ao tratamento testemunha com 4,88 cm por plântula (Fig. 2C). O teste de CR é baseado no crescimento das plântulas, e serve como um indicativo de vigor das sementes. Sementes vigorosas são mais eficientes em mobilizar as reservas dos tecidos de armazenamento para o eixo embrionário, refletindo em crescimento mais rápido e uniforme (Marcos Filho, 2015b).

Condutividade elétrica

No Exp 1 a CE foi menor para a testemunha com 32,35 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ comparado aos tratamentos que receberam a inoculação e a coinoculação com 35,55 e 38,62 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$

respectivamente (Fig. 1E). O teste de CE é um teste bioquímico indicativo da liberação de solutos pelas sementes durante o processo de embebição, sendo que sementes menos vigorosas ou mais deterioradas liberam maior quantidade de solutos para o meio externo (Marcos Filho, 2015b). Ressalta-se que lotes de sementes com valores abaixo de 70 – 80 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ são considerados de alto vigor (Krzyzanowski *et al.*, 1999). Portanto, apesar de existir diferença estatística entre as inoculações, ambas são consideradas de alto vigor pelo teste de CE.

Envelhecimento acelerado

Esta variável apresentou interação significativa em ambos experimentos. No Exp 1 a testemunha obteve em média 75,0 % de germinação no teste de EA, sem ajuste de nenhuma equação (Fig. 1F). Já a inoculação obteve um ajuste linear crescente, variando de 59,0 % na dose zero, até atingir o valor 76,0 % na dose de 60 kg ha^{-1} de S. No tratamento com a coinoculação na dose zero obteve-se 81,0 %, ocorrendo um decréscimo com a aplicação de doses de S chegando a um valor mínimo de 73,0 % na dose de 30 kg ha^{-1} de S, voltando a subir e chegando ao valor de 81,0 % na dose de 60 kg ha^{-1} de S. No Exp 2 o tratamento testemunha teve um ajuste linear crescente para as doses de S variando de 18,0 % na dose zero, para 37,0 % na dose de 60 kg ha^{-1} de S. A coinoculação foi superior à testemunha até a dose de 40 kg S ha^{-1} , com decréscimo a partir desta dose (Figura 2D).

Observou-se que em ambos experimentos, a coinoculação se mostrou superior aos demais tratamentos. O teste de EA fornece informações sobre a taxa de deterioração de sementes quando as mesmas são submetidas a condições de temperatura e umidade elevadas, simulando o armazenamento e indicando o potencial de emergência de plântulas a campo (César *et al.*, 2009; Marcos Filho, 2015b).

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas são referentes às plântulas provenientes da germinação de sementes obtidas do experimento de Santa Maria (Exp 1). Para a variável carotenóides houve efeito significativo para os tipos de inoculações, e para as demais variáveis houve interação significativa entre tipos de inoculações e doses de S (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância representado pelos quadrados médios para as variáveis fisiológicas com plântulas do experimento de Santa Maria (Exp 1).

FV ¹	GL ³	Parte aérea							Sistema radicular		
		H ₂ O ₂ ⁴	POD	SOD	CLa	CLb	CLtotal	CAR	H ₂ O ₂	POD	SOD
Inoculação (INO)	2	0,00*	489,42*	269,38*	0,01*	0,00*	0,03*	0,00*	0,05*	8441,51*	1829,41*
Enxofre (S)	3	0,00 ^{ns}	113,29*	141,62*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00 ^{ns}	0,00*	16,66 ^{ns}	136,71 ^{ns}
INO x S	6	0,00*	182,56*	316,08*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00 ^{ns}	0,00*	28,16*	309,34*
Erro	36	0,00	24,27	38,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	910,06	51,05
Média	-	0,03	37,23	44,74	0,05	0,02	0,13	0,01	0,09	126,63	43,74
CV (%) ²	-	21,18	13,23	13,94	16,26	25,82	14,91	30,24	24,23	23,82	16,33

¹Fonte de variação (FV), ²coeficiente de variação (CV%), ³graus de liberdade do erro (GL), ⁴Variáveis explicativas: *peróxido de hidrogênio* (H₂O₂, μmol g⁻¹ matéria fresca), *guaiacol peroxidase* (POD, U mg⁻¹ de proteína), *superóxido dismutase* (SOD, U mg⁻¹ de proteína), *clorofila a* (CLa, mg/g FW), *clorofila b* (CLb, mg/g FW), *clorofila total* (CLtotal, mg/g FW), e *carotenóides* (CAR, mg/g FW). *significativo e ^{ns}não significativo pelo teste de F ($\alpha \leq 0,05$).

Peróxido de hidrogênio

O conteúdo de H₂O₂ foi influenciado pela aplicação das doses de S e dos tipos de inoculação, nas raízes e na parte aérea (Fig. 3 A, B). Na parte aérea houve aumento no conteúdo de H₂O₂ para o tratamento testemunha em doses acima dos 40 kg de S, indicando uma situação de estresse oxidativo. Para o tratamento com inoculação, houve redução linear enquanto para a coinoculação não houve efeito significativo, com média de 0,0180 μmol g⁻¹ de matéria fresca, mantendo em nível abaixo dos demais tratamentos em todas as doses avaliadas (Fig. 3 A). Para o sistema radicular houve efeito significativo apenas para o tratamento coinoculado,

com ajuste quadrático crescente chegando a $0,2168 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca com a aplicação de 46 kg de S, enquanto a testemunha e a inoculação apresentaram em média $0,0531$ e $0,0606 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca (Fig. 3B). Esse aumento na concentração de peróxido de hidrogênio no tratamento coinoculado com o aumento da concentração de S tem relação com a atividade da enzima peroxidase (Fig. 3D) e possivelmente não ocasionou dano nas plântulas, uma vez que as plântulas desse tratamento apresentaram alto vigor e qualidade fisiológica.

O H_2O_2 é considerado uma ERO, que é uma das formas reduzida ou excitada do oxigênio atmosférico, e estas são formadas principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, de modo geral em organelas que possam doar ou excitar um elétron para o oxigênio atmosférico (Karuppanapandian *et al.*, 2011). As ERO atuam como moléculas indicadoras de situações de estresse nas plantas, regulam o desenvolvimento, a diferenciação, respostas ao ambiente e a morte celular (Mittler, 2017). Na presente pesquisa observou-se maior nível de H_2O_2 na parte aérea das plântulas obtidas do tratamento testemunha, servindo como um indicativo de menor disponibilidade de N, evidenciada pela menor concentração de proteína nas sementes (Tabela 2, exp 1), e pela menor nodulação observada nas plantas genitoras das sementes para este tratamento (dados não apresentados).

Superóxido dismutase e Guaiacol peroxidase

As ERO são removidas por mecanismos antioxidantes, os quais atuam de maneira constante afim de evitar o estresse oxidativo, que inclui a oxidação ou danos ao DNA, RNA, proteínas e membranas (Mittler, 2017). O sistema antioxidante é composto principalmente por enzimas, que tem por finalidade manter as ERO em níveis baixos, considerados não tóxicos, e a concentração e/ou atividade destas no tecido foliar serve como um indicador de situações de estresse em plantas (Mittler *et al.*, 2004). Em uma situação estressante com elevação nos níveis de ERO, ocorre a ativação de genes codificantes de enzimas antioxidantes como

resposta a este estresse (Barbosa *et al.*, 2014). Fazem parte deste sistema antioxidante as enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) (Barbosa *et al.*, 2014).

A atividade da enzima SOD foi influenciada pelas doses de S e pelas inoculações (Fig. 3E, F). Na parte aérea das plantas houve redução linear na atividade enzimática com a aplicação de S quando utilizada a inoculação e a coinoculação, enquanto no tratamento testemunha houve aumento na atividade enzimática (Fig. 3E). No sistema radicular houve efeito significativo apenas para a inoculação, que teve maior atividade enzimática com a aplicação de S (Fig. 3F), enquanto a testemunha foi o tratamento com a menor atividade, sendo 32,64 mg U mg⁻¹ de proteína, e a coinoculação com média de 53,97 mg U mg⁻¹ de proteína. A menor atividade da enzima SOD na parte aérea para a inoculação e coinoculação com a aplicação de S pode indicar que a aplicação destes tratamentos a campo proporcione condições mais adequadas para a produção de sementes com maior capacidade de defesa contra as ERO. Isso deve-se a maior nodulação das plantas inoculadas e coinoculadas, consequentemente maior disponibilidade de N, bem como pela adubação com S, reduzindo a produção de ERO e consequentemente exigindo menor atividade da SOD. No tratamento testemunha, o aumento na atividade da SOD na parte aérea tem relação com o conteúdo de H₂O₂ (Fig. 3A), uma vez que essa enzima é responsável por dismutar o ânion superóxido, produzindo H₂O₂, ou seja, a maior atividade da SOD ocasionou maior produção de H₂O₂ nesse tratamento, indicando uma situação de estresse oxidativo.

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) também foi influenciada pelas inoculações e pelas doses de S. Na parte aérea a maior atividade foi verificada para o tratamento que recebeu a inoculação e a aplicação de 31 kg ha de S, chegando a 35,48 mg U mg⁻¹ de proteína (Fig. 3C). No sistema radicular apenas o tratamento inoculação teve aumento linear na atividade da POD pela aplicação de S, variando entre 118,11 e 170,20 mg U mg⁻¹ de proteína entre a dose zero e 60 kg de S ha⁻¹ (Fig. 3D). A testemunha e a coinoculação não foram influenciadas pela aplicação do S, obtendo em média 113,53 e 113,19 mg U mg⁻¹ de proteína respectivamente. Pode-se observar nas raízes do tratamento inoculado, houve um aumento na atividade das enzimas SOD e POD, as quais podem ter sido responsáveis pela

manutenção dos níveis estáveis de H_2O_2 nas células. Na parte aérea, o aumento na atividade da POD e a redução na atividade da SOD justificam a concentração de peróxido de hidrogênio nos tratamentos inoculados e coinoculados. Além disso, a atividade combinada dessas duas enzimas pode ter relação positiva com o vigor das plântulas nesses tratamentos.

Clorofilas e carotenóides

O conteúdo de pigmentos fotossintéticos sendo clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e clorofila total (Chl *total*) estão representados nas figuras 4 A, B e C respectivamente. As plântulas originadas do tratamento com a coinoculação foram as que apresentaram maior teor de Chl *total*, e também foi o único tratamento que não teve influência da aplicação de S, com média de 0,1744 mg/g FW (Fig. 4C). Para o tratamento testemunha e para a inoculação houve incremento linear crescente no teor de Chl *total* com a aplicação de doses de S, a testemunha apresentou os menores teores, variando entre 0,0625 e 0,1100 mg/g FW, e a inoculação variou entre 0,1250 e 0,1570 mg/g FW entre as doses zero e 60 kg de S ha^{-1} .

Apesar de não ser constituinte da molécula de clorofila, o S faz parte da ferredoxina, uma proteína Fe-S presente nos cloroplastos, que participa do transporte de elétrons no processo de formação da clorofila (Pagani e Echeverría, 2012). Além de favorecer a FBN e conseqüentemente o acúmulo de N nas folhas e sementes. Conforme verificado nesta pesquisa, houve maior teor de Chl *total* para o tratamento coinoculado, indicando possível incremento no acúmulo de N nas sementes, o que resultou em maior produção de proteínas (Tabela 2), e conseqüentemente favoreceu a produção de clorofila. O aumento linear do teor de Chl *total* para a testemunha e para a inoculação está relacionado a maior disponibilidade de S, demonstrando a importância do S na síntese de clorofila (Pagani e Echeverría, 2012). As clorofilas são responsáveis pela captação da energia luminosa, influenciando na taxa fotossintética das plantas. Deste modo, plântulas com maior produção de Chl *total* tendem a

absorver maior energia luminosa e consequentemente apresentar maior vigor inicial, conforme verificado pelo teste de PC (Fig. 1A).

De modo semelhante, para os carotenóides observou-se que a inoculação e a coinoculação ambas com 0,0100 mg/g FW foram superiores ao tratamento testemunha que apresentou 0,0018 mg/g FW (Fig. 4D). Os carotenóides são considerados pigmentos acessórios, e auxiliam o sistema celular no processo de defesa antioxidante, atuando na fotoproteção, evitando a formação de radicais livres ou promovendo a sua degradação, prevenindo danos às células dos vegetais (Barbosa *et al.*, 2014). Assim, pode-se dizer que os tratamentos com inoculação e coinoculação, por possibilitar maior produção de carotenóides, possuíam maior capacidade de eliminar radicais livres, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo (Wahid, 2007), consequentemente permitindo a expressão do vigor das plântulas conforme verificado nos testes de vigor (Fig. 1A). A análise genômica revelou funções de sinalização entre compostos intermediários da via biossintética da clorofila que regulam a produção transcricional de proteínas de ligação à clorofila coletoras de luz (carotenos e xantofilas) (Lohr *et al.*, 2005). Isso indica uma relação próxima entre as rotas de biossíntese de clorofilas e carotenóides, o que justifica o efeito positivo da inoculação e coinoculação sobre a produção de carotenóides.

Conclusões

A adubação com S, combinada com a coinoculação de plantas genitoras proporciona um controle adequado das enzimas antioxidantes e de peróxido de hidrogênio e aumenta o conteúdo de clorofilas e carotenóides, possibilitando a expressão do potencial fisiológico de sementes e vigor das plântulas originadas dessas sementes.

REFERÊNCIAS

- Barbosa MR, Silva, MMA, Willadino L, Ulisses C e Camara TR** (2014). Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* **44**, 453-460.
- Bashan Y, Bashan LE, Prabhu SR e Hernandez JP** (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* **378**, 1-33.
- Beauchamp C e Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochemistry* **8**, 276-287.
- Becana M, Wienkoop S and Matamoros MA** (2018) Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1-10.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** (2013) Padrões para produção e comercialização de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2013, p. 29.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** (2009) Regras para análise de sementes. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009.
- Brzezinski CR, Abati J, Henning FA, Henning AA, França Neto JB, Krzyzanowski FC e Zucareli C** (2017) Spray volumes in the industrial treatment on the physiological quality of soybean seeds with different levels of vigor. *Journal of Seed Science* **39**, 174-181.
- Carvalho NM e Nakagawa J** (2012) Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: Funep.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C e Luna V** (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* **45**, 28–35.
- César ML, Fonseca NR, Toledo MZ, Soratto RP, Cavariani C e Crusciol CAC** (2008). Aplicação de enxofre em cobertura e qualidade fisiológica de sementes de feijão. *Acta Scientiarum. Agronomy* **30**, 681–686.

CQFS - Comissão de Química e Fertilidade do Solo (2016) Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porto Alegre, SBCS, 376p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2020) Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2020. Brasília, DF: Conab.

Crusciol CAC, Soratto (RP, Silva LM e Lemos LB (2006) Aplicação de enxofre em cobertura no feijoeiro em sistema de plantio direto. *Bragantia* **65**, 459–465.

Dhage SJ, Patil VD e Patange MJ (2014) Effect of various levels of phosphorus and sulphur on yield, plant nutrient content, uptake and availability of nutrients at harvest stages of soybean [*Glycine max* (L.)]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **3**, 833–844.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2018) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5. ed. Brasília, 356p.

Fehr WR e Caviness C (1977). Stages of soybean development. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Special Report, 80).

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* **35**, 1039–1042.

Getachew Z, Abera G e Beyene S (2017) Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrients uptake and protein quality of soybean (*Glycine max* L.) varieties on Nitisols of Assosa area, Western Ethiopia. *African Journal of Plant Science* **11**, 123–132.

Giannopolitis CN e Ries SK (1977) Purification and quantitative relationship with watersoluble protein in seedlings. *Journal of Plant Physiology* **48**, 315–318.

Guerra CA, Marchetti ME, Robaina AD, Souza, CF, Gonçalves MC e Novelino JO (2006) Qualidade fisiológica de sementes de soja em função da adubação com fósforo, molibdênio e cobalto. *Acta Scientiarum. Agronomy* **28**, 91–97.

Hiscox JD e Israelstam GF (1979) Method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **57**, 1332–1334.

Horowitz N e Meurer EJ (2006) Oxidação do enxofre elementar em solos tropicais. *Ciência Rural* **36**, 822–828.

- Hungria M, Nogueira MA e Araujo RS** (2015) Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. *African Journal of Agricultural Research* **10**, 2329–2338.
- Hungria M, Nogueira MA e 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.
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim Changsoo, Manoharan K e Kim W** (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* **5**, 709–725.
- Krishnan HB e Jez JM** (2018) The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. *Plant science* **272**, 14–21.
- Krzyzanowski FC** (1999) *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: Abrates.
- Jamal A, Moon YS e Zainul Abidin M** (2010). Enzyme activity assessment of peanut (*Arachis hypogea* L.) under slow-release S fertilization. *Australian Journal of Crop Science* **4**, 169–174.
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and Carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350–382.
- Lohr M, Im C e Grossman AR** (2005) Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **138**, 490–515.
- Loreto F e Velikova V** (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* **127**, 1781–1787.
- Mahmoud AA, Natarajan SS, Bennett JO, Mawhinney TP, Wiebold WJ e Krishnan HB** (2006) Effect of six decades of selective breeding on soybean protein composition and quality: a biochemical and molecular analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3916–3922.
- Marcos Filho** (2015a) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba. Fealq, 659p.
- Marcos Filho** (2015b) Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola* **72**, 363–374.

- Marcos Filho J, Novembre ADC e Chamma HMCP** (2001) Testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de soja. *Scientia Agricola* **58**, 421–426.
- Masciarelli O, Llanes A e Luna V** (2014) A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research* **169**, 609–615.
- Mittler R** (2017) ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11–19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M e Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490–498.
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **9**, 405–410.
- Nakagawa J** (1999) Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanoski FC, Vieira RD and França Neto JB (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. ABRATES, 2.1–2.24.
- Pagani A e Echeverría HE** (2012) Influence of sulfur deficiency on chlorophyll-meter readings of corn leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **175**, 604–613.
- Queiroz Rego CH, Cardoso FB, da Silva Cândido AC, Teodoro PE e 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.
- Soltani A, Gholipour M e Zeinali E** (2006) Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany* **55**, 195–200.
- Steel RGD, Torrei JH e Dickey DA** (1997) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3. ed. New York: McGraw Hill Book, 666p.
- Sutar RK, Pujar AM, Kumar BA e Hebsur NS** (2017) Sulphur nutrition in maize-a critical review. *International Journal of Pure Applied Bioscience* **5**, 1582–1596.
- USDA - United States Department Of Agriculture** (2014) Keys to soil taxonomy. 12 ed. 372 p.

Varin S, Cliquet JB, Personeni E, Avice JC e Lemauviel-Lavenant S (2010) How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)?. *Journal of Experimental Botany* **61**, 225–234.

Wahid A (2007) Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plant Research* **120**, 219–228.

Zeraik AE, Souza FS e Fatibello-Filho O (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova* **31**, 731–734.

Zhu Z, Wei G, Li J, Qian Q e Yu J (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* **167**, 527–533.

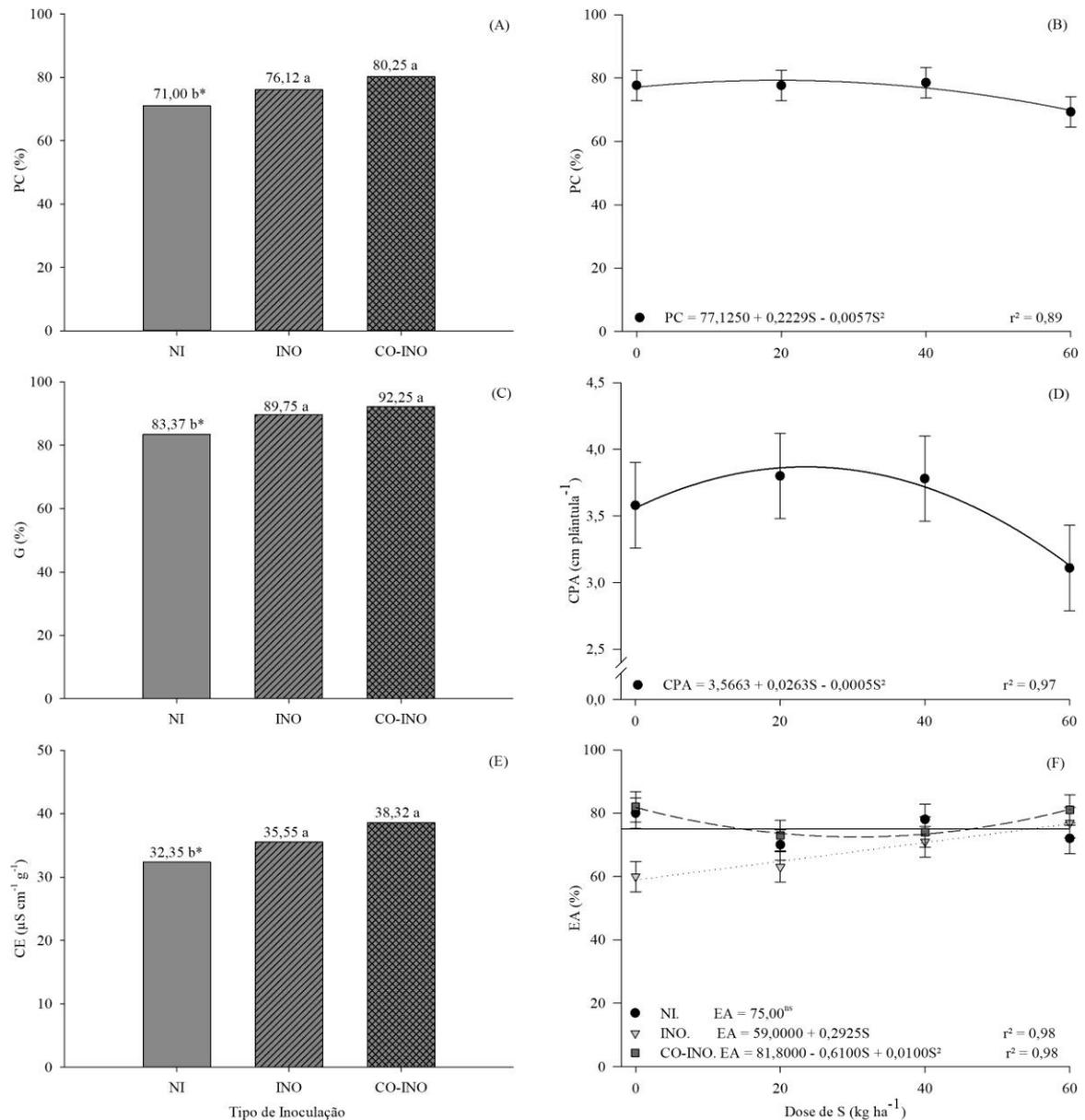
Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Conflito de interesses

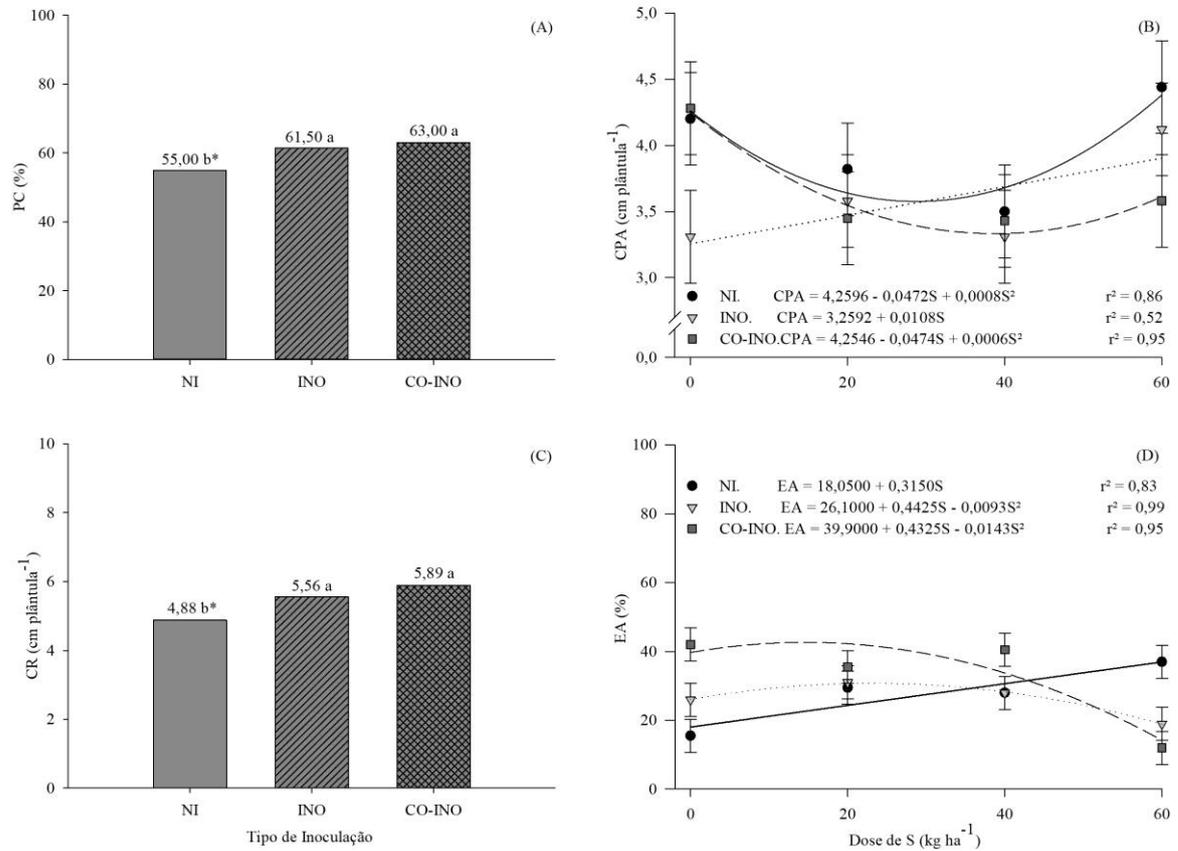
Nenhum.

Fig. 1. Resultados dos testes de primeira contagem (A e B), germinação (C), comprimento de parte aérea (D), condutividade elétrica (E), e de envelhecimento acelerado (F), de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), para o Exp 1.



*médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Fig. 2. Resultados dos testes de primeira contagem (A), comprimento de parte aérea (B), comprimento de raiz (C) e de envelhecimento acelerado (D), de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹) para o Exp 2.



*médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Fig. 3. Conteúdo de peróxido de hidrogênio na parte aérea (A) e raízes (B), atividade da enzima guaiacol peroxidase na parte aérea (C) e raízes (D), e atividade da enzima superóxido dismutase na parte aérea (E) e raízes (F) de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), para o Exp. 1.

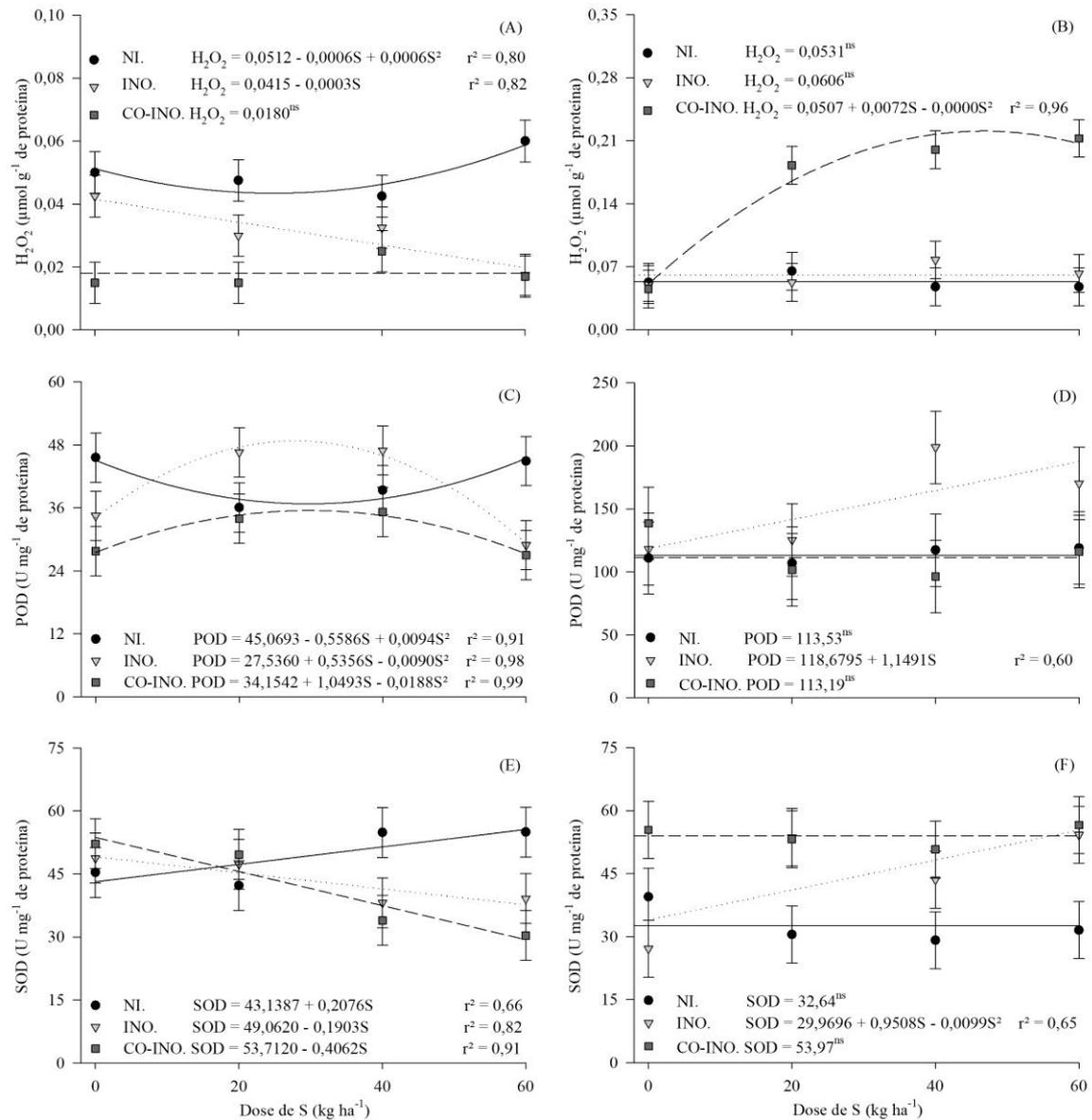
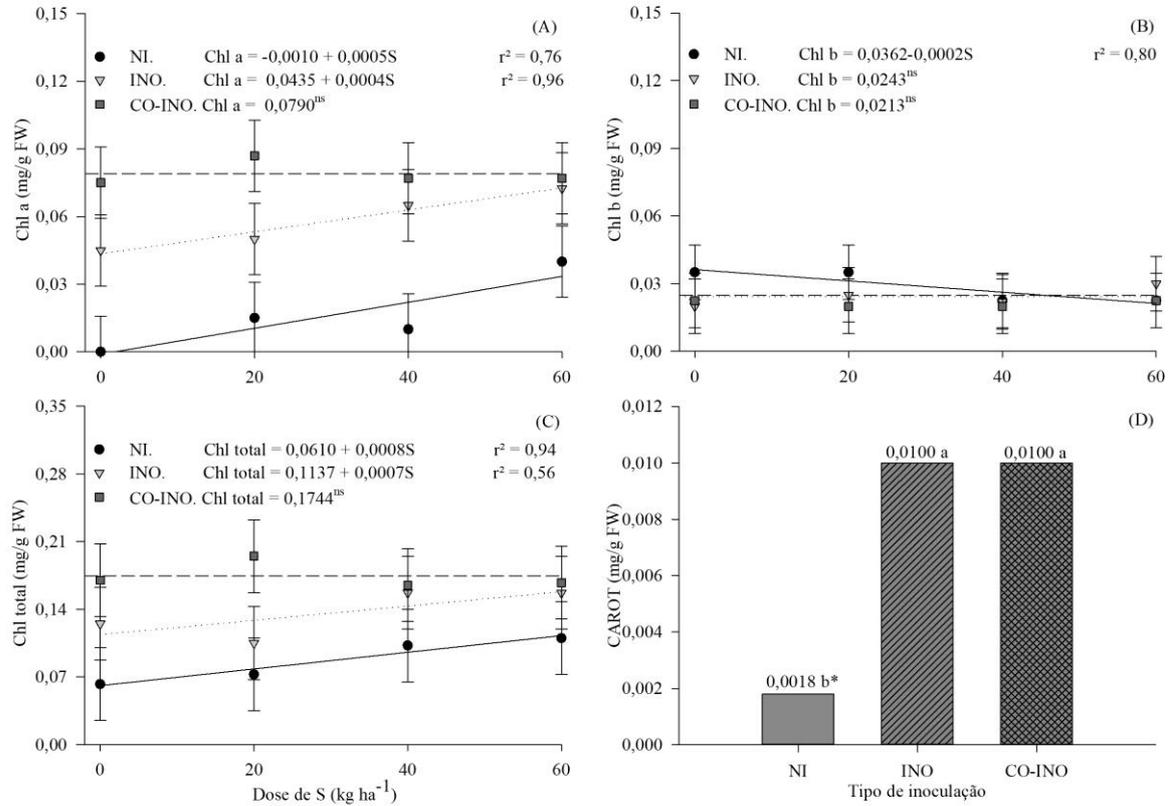


Fig. 4. Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) de plântulas de soja oriundas de plantas que receberam tipos de inoculação [Testemunha (NI), Inoculação (INO) e Coinoculação (CO-INO)] e doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹) para o Exp. 1.



*médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O elevado teor de óleo e principalmente de proteína nos grãos de soja, aliado ao baixo custo de produção quando comparada a outras fontes de proteína, direcionam o mercado para a utilização do farelo de soja como a principal fonte de proteína na alimentação animal. Durante o processo de formação de proteína, um nutriente indispensável para as plantas é o nitrogênio (N), que constitui aproximadamente 16,5 % das proteínas, o que torna a cultura da soja altamente exigente em N, com uma demanda média de 80 kg por tonelada de grãos produzidos. Deste modo, a deficiência de N pode acarretar em redução no teor de proteína nos grãos, influenciando no custo final da ração, pois será necessário utilizar maior proporção de farelo de soja na formulação de ração. Além disso, quando se pensa na produção de sementes, a qualidade destas também é afetada pela concentração de proteína, pois as proteínas são uma das fontes de reserva utilizadas no processo de germinação, e uma redução no percentual destas pode resultar em menor vigor de sementes e também no percentual de germinação.

Sabendo que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal e mais econômica fonte de N para a cultura da soja no Brasil, deve-se adotar práticas de manejo que promovam condições favoráveis para a relação entre plantas e microrganismos, permitindo que a FBN tenha condições suprir a demanda de N para lavouras com alto potencial produtivo. Neste contexto, a disponibilidade do nutriente enxofre (S) em níveis adequados, e na forma assimilável pelas plantas é indispensável para a nodulação e atividade dos bacterióides responsáveis pela FBN.

Diante disso, nesta pesquisa, combinamos a inoculação (*Bradyrhizobium* spp.) e a coinoculação (*Bradyrhizobium* spp. com *Azospirillum brasilense*), com doses de enxofre (0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹), e avaliou-se a nodulação, componentes da produtividade, e também qualidade de grãos e sementes de soja, buscando identificar práticas que possam auxiliar técnicos e produtores na tomada de decisão do manejo de sua cultura.

A prática da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. é utilizada há muitas décadas no Brasil, e nesta pesquisa foi eficiente em promover a nodulação das plantas, no entanto, quando se fez a coinoculação que é uma prática recente que visa a utilização de

Bradyrhizobium spp. juntamente com *Azospirillum brasilense*, os resultados de nodulação foram superiores. Além disso, a qualidade de grãos foi superior nestes tratamentos, atribuindo-se isso a maior FBN e conseqüentemente maior conversão de nitrogênio atmosférico, o que resultou em maior acúmulo de massa seca de plantas e também de proteína nos grãos. Este é um resultado interessante, pois existe a tendência que futuramente a negociação de grãos de soja seja realizada por classes de qualidade, semelhante ao que já ocorre com o trigo, e a partir desta classificação será realizada a remuneração ao produtor, sendo a coinoculação uma importante ferramenta pensando em qualidade de grãos.

Em relação ao S, neste experimento utilizou-se o S-elementar, uma forma que para se tornar disponível às plantas precisa ser oxidado a sulfato, forma que é assimilável pelas plantas. Conforme avaliações realizadas, a oxidação ocorreu, e na safra 2017/2018 o S elementar foi eficiente em elevar o teor de sulfato no solo acima do nível crítico para a cultura da soja. Porém, deve-se ter cuidado quanto a dose de S elementar a ser utilizada, o processo de oxidação é realizado por meio de bactérias no solo, e este processo resulta na liberação de ácido sulfúrico, liberando íons H^+ no solo, causando a acidificação do meio. Como se sabe a redução do pH do solo pode ser prejudicial para a cultura da soja, e também para a nodulação. Deste modo, no primeiro ano de condução dos experimentos observou-se que doses superiores aos 40 kg de S por hectare foram prejudiciais para a nodulação das plantas.

Em relação a qualidade de sementes foram observados resultados positivos no vigor e na germinação, sendo superiores nas sementes oriundas de plantas que receberam a inoculação e a coinoculação. O uso de sementes com garantia de germinação e principalmente vigor é indispensável pensando no estabelecimento da cultura da soja. Pensando no alto investimento e também no retorno econômico da cultura, a coinoculação se apresenta como uma alternativa de baixo custo para a obtenção de sementes com vigor e germinação, e deve ser uma prática adotada por produtores de sementes.

De modo geral, nesta pesquisa a coinoculação não resultou em incremento na produtividade de grãos, porém, os benefícios obtidos na qualidade de grãos e também na qualidade de sementes são importantes para a cultura da soja, e indicam que pesquisas

relacionadas a essa prática devem ser contínuas, pois a qualidade de grãos não pode ser perdida com o aumento na produtividade ao longo dos anos. Em relação ao S-elementar, este se mostrou eficiente em determinadas situações, sendo uma alternativa de fácil reposição de enxofre ao sistema, porém deve-se ter atenção quanto as doses. A adubação com enxofre precisa ser adotada pelos produtores, seja utilizando o S-elementar, ou buscando utilizar fertilizantes que possuam este nutriente em sua formulação.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de enxofre elementar em doses entre 20 e 40 kg ha⁻¹ promove a nodulação, o acúmulo de massa seca de plantas, a produtividade e a qualidade de grãos de soja, além de beneficiar a nodulação quando combinado com a coinoculação de *Bradyrhizobium* ssp. e *Azospirillum brasilense*.

A adubação com S, combinada com a coinoculação de plantas genitoras proporciona um controle adequado das enzimas antioxidantes e de peróxido de hidrogênio e aumenta o conteúdo de clorofilas e carotenóides, possibilitando a expressão do potencial fisiológico de sementes e vigor das plântulas originadas dessas sementes.

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, p. 527-534, 2001.
- ALEXANDRE, G. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2283-2293, 2010.
- ALVAREZ, J. W. R. **Disponibilidade e resposta de culturas ao enxofre em solos do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria. 84p.
- ARAUJO, 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**, 2017.
- ASHRAF, M. A.; RASOOL, M.; MIRZA, M. S. Nitrogen fixation and índole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Research**, v. 5, p. 348–355, 2011.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, p. 77-136, 2010.
- BECANA, M.; WIENKOOP, S.; MATAMOROS, M. A. Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. **Frontiers in PlantScience**, v. 9, p. 1-10, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**: Mapa/ACS, 2009.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 155-194, 2005.
- BROCH, D. L. et al. Produtividade da soja no cerrado influenciada pelas fontes de enxofre. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 3, p. 791-796, 2011.

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 147, n. 1, p. 1- 9, 2014.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: Funep, 2012.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CHIBEBA, A. M, et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1641–1649, 2015.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 2.ed., Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2020**. Brasília, DF: Conab, 2020.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 1-7, 2011.

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, p. 1327-1334, 2019.

FIBACH-PALDI, S. et al. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99-108, 2012.

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.

GETACHEW, Z.; ABERA, G.; BEYENE, S. Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrients uptake and protein quality of soybean (*Glycine max* L.) varieties on Nitisols of Assosa area, Western Ethiopia. **African Journal of Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 123–132, 2017.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 511-516, 2000.

KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Angers France v. 2, p. 879–882, 1978.

KRISHNAN, H. B.; JEZ, J. M. The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. **Plant science**, v. 272, p. 14-21, 2018.

HIRAKURI, M. H. et al. Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HOROWITZ, N.; MEURER, E. J. Oxidação do enxofre elementar em solos tropicais. **Ciência Rural**, v. 36, n. 03, p. 822-828, 2006.

HUNGRIA, M. et al. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1106-1112, 2017.

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, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium, 2006. p.43-93.

HUNGRIA, M., VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crop Research**, v. 65, 151–164, 2000.

JEMAL, A.; MOON, Y. S.; ABDIN, M. Z. Enzyme activity assessment of peanut (*Arachis hypogea*L.) under slow-release S fertilization. **Australian Journal Crop Science**, v. 4, n. 3, p. 169-174. 2010.

LÓPEZ GARCÍA, S. L. et al. In-furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* nodulation. **Agronomy Journal**, v. 101, p. 357-363, 2009.

LUCHETA, A. R.; LAMBAIS, M. R. Enxofre na agricultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1369-1379, 2012.

MAHMOUD, A. A. et al. Effect of six decades of selective breeding on soybean protein composition and quality: a biochemical and molecular analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3916-3922, 2006.

MALAVOLTA, Eurípedes. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.

MELCHIORRE, M. et al. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. **Biology Fertility Soils**, v. 47, p. 81-89, 2011.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇANETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, 1999. v. 2. p.1 -21.

PIPOLO, A. E. et al. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. Embrapa Soja, 2015. 15p. (Embrapa Soja. Circular técnica 86).

PIPOLO, A. E.; SINCLAIR, T. R.; CAMARA, G. M.S. Effects of temperature on oil and protein concentration in soybean seeds cultured in vitro. **Annals of applied biology**, v. 144, n. 1, p. 71-76, 2004.

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

PRANDO, A. M. et al. Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2019.

QUEIROZ REGO, C. H. et al. Co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* increases yield and quality of soybean seeds. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 6, p. 2302-2309, 2018.

- REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, p. 350-68, 2005.
- RODRIGUES, A. C. et al. Azospirillum sp. as a challenge for agriculture. In: **Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem**. Springer, Cham., p. 29-51, 2015.
- SAIK, R. D. The evolution of a sulphur bentonite fertilizer: one company's perspective. *Sulphur in Agriculture*, v. 19, p. 74-77, 1995.
- SALVAGIOTTI, F. et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.
- SILVA, E. R. et al. A co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* pode aliviar os efeitos adversos do estresse hídrico na soja (*Glycine max* L. Merrill.)?. **Arquivos de microbiologia**, v. 201, n. 3, p. 325-335, 2019.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TIECHER, T. et al. **Evolução e estado da fertilizade do solo no norte do Rio Grande do Sul e Sudoeste de Santa Catarina**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- 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.
- ZILLI, J. E., CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, p. 335-338, 2010.
- ZUFFO, A. M. et al. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 87-93, 2015.
- WANG, S. et al. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1250–1258, 2009.
- UDVARDI, M. et al. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 781-805, 2013.
- VARIN, S. et al. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)?. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 225-234, 2010.

VITTI, G. C.; OTTO, R.; SAVIETO. Manejo do enxofre na agricultura. **Informações Agronômicas**, nº 152, p. 1 – 14, 2015.