

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

Jessica Deolinda Leivas Stecca

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM
OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO**

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Jessica Deolinda Leivas Stecca

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM
OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestra em Agronomia**

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

**Santa Maria, RS, Brasil.
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Leivas Stecca, Jessica Deolinda
INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM
OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO / Jessica
Deolinda Leivas Stecca.- 2017.
51 p.; 30 cm

Orientador: Thomas Newton Martin
Coorientadores: Ubirajara Russi Nunes, Alessandro
Dal'Col Lúcio, Amauri Nelson Beutler
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2017

1. Pré-inoculação em soja 2. Utilização de osmoprotetor
3. Sobrevivência de rizóbios I. Newton Martin, Thomas
II. Russi Nunes, Ubirajara III. Dal'Col Lúcio,
Alessandro IV. Beutler, Amauri Nelson V. Título.

© 2017 Todos os direitos autorais reservados a Jessica Deolinda Leivas Stecca. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Avenida São Sepé nº 289, Bairro Centro, Vila Nova do Sul, RS, 97385-000. Fone: +55 55 999959685; E-mail: jessica.stecca@yahoo.com.br

Jessica Deolinda Leivas Stecca

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM
OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestra em Agronomia**

Aprovada em 02 de março de 2017:

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

Amauri Nelson Beutler, Dr. (UNIPAMPA, Campus de Itaqui)

Alessandro Dal'Col Lúcio, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil.
2017

DEDICO

A meus pais José Lourenço e Vera Lúcia, e minha tia Maria por me darem apoio nas minhas decisões e me orientarem sempre seguir o caminho mais correto.

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

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

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

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

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

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao Professor Alessandro Dal'Col Lúcio pela paciência e dedicação para conseguirmos realizar o trabalho proposto.

Aos queridos amigos e colegas da Pós-Graduação (“Só nós da Pós”): Tânia, Glauber, Vinícius, Evandro, Giovane, Marlo e Eduardo pela parceria, amizade e dias de descontração na locadora e CE.

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

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

A meu companheiro, amigo e namorado Thiago, que me apoiou nos momentos difíceis, me incentivando e fazendo acreditar que sou capaz de realizar meus sonhos.

Muito obrigada!

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

José de Alencar

RESUMO

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO

AUTORA: Jessica Deolinda Leivas Stecca

ORIENTADOR: Thomas Newton Martin

A demanda pela viabilização da inoculação de sementes dias anteriores à semeadura vem desafiando os cientistas a desenvolverem tecnologias que não afetem a sobrevivência de bactérias inoculadas e que contribuam para aumentar a produtividade da cultura da soja. Dentre as novas tecnologias destaca-se a utilização de osmoprotetores. Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo a viabilidade da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor, realizada em diferentes dias pré-semeadura, bem como o efeito de diferentes condições de pH do solo sobre os componentes de produtividade, nodulação e produtividade de grãos da cultura da soja. Para tanto foram conduzidos dois experimentos em duas épocas de semeadura, na safra 2015/2016, utilizando duas cultivares de soja (NA 5909RR e NS 6209RR), submetidas a dois pH do solo (5,3 e 6,5) e inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor (no dia, 4 e 11 dias anteriores à semeadura, para a primeira época; no dia, 7 e 14 dias anteriores à semeadura, para a segunda época). As sementes da cultivar NA 5909RG que foram inoculadas aos quatro e sete dias pré-semeadura, com utilização de osmoprotetor juntamente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, proporcionaram produtividades 10,8% e 8,3% superiores comparados aos tratamentos realizados nos mesmos dias sem osmoprotetor, em solo com pH 5,3. O osmoprotetor juntamente com a inoculação de *Bradyrhizobium* é uma alternativa para utilização em solos com pH baixo, pois proporciona maior número e massa seca de nódulos e conseqüentemente maior produtividade de grãos. O solo com menor condição de acidez foi responsável pela maior produtividade de grãos, comparado ao solo de maior acidez, quando ambos não receberam inoculação das sementes. A análise de componentes principais mostrou-se eficiente destacando a importância da manutenção da variável produtividade de grãos, devido ao seu maior poder de explicação e contribuição na variabilidade existente nos dados do experimento.

Palavras - chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Fixação biológica de nitrogênio. Sobrevivência. Inoculação antecipada. Acidez do solo.

ABSTRACT

INOCULATION OF SOYBEAN SEEDS COATED WITH OSMOPROTETOR IN DIFFERENT SOIL pH

AUTHOR: Jessica Deolinda Leivas Stecca

ADVISER: Thomas Newton Martin

The demand for the viability of seed inoculation days before sowing has challenged scientists to develop technologies that do not affect the survival of inoculated bacteria and that contribute to increase the productivity of the soybean crop. Among the new technologies, the use of osmoprotectants stands out. The objective of this study was the viability of the inoculation with *Bradyrhizobium* bacteria associated with the osmoprotective coating, performed on different pre-sowing days, as well as the effect of different soil pH conditions on the productivity components, Nodulation and grain yield of the soybean crop. Two experiments were carried out in two sowing seasons, in the 2015/2016 harvest, using two soybean cultivars (NA 5909RR and NS 6209RR), submitted to two soil pHs (5.3 and 6.5) and inoculation with bacteria of the genus *Bradyrhizobium* associated with the osmoprotective coating (on the day, 4 and 11 days before sowing, for the first epoch, on the day, 7 and 14 days before sowing, for the second epoch). The seeds of the cultivar NA 5909RG that were inoculated at four and seven days pre-sowing, using osmoprotect together with bacteria of the genus *Bradyrhizobium*, provided yields 10.8% and 8.3% higher compared to the treatments performed on the same days without osmoprotectant, in soil with pH 5.3. The osmoprotector together with the *Bradyrhizobium* inoculation is an alternative for use in soils with low pH, as it provides a greater number and dry mass of nodules and, consequently, higher yield of grains. Soil with lower acidity was responsible for higher grain yield, compared to the soil with higher acidity, when both were not inoculated. Principal component analysis proved to be efficient, highlighting the importance of maintaining the grain yield variable, due to its greater explanatory power and contribution to the variability in the experiment data.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill. Biological fixation of nitrogen. Survival. Anticipated inoculation. Acidity of soil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de nódulos em R2 (NNP, planta ⁻¹), massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta ⁻¹), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta ⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para a cultivar NA 5909RG, para primeira e segunda época de semeadura.	28
Tabela 2 - Número de nódulos em R2 (NNP, planta ⁻¹), massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta ⁻¹) e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta ⁻¹) para a cultivar NS 6209RR em função do momento de inoculação das sementes da soja, para primeira e segunda época de semeadura.	30
Tabela 3 - Massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta ⁻¹), número de legumes (NLP, planta ⁻¹) e massa de mil grãos (MMG, g) para a cultivar NS 6209RR semeada na primeira época e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta ⁻¹) para a cultivar NA 5909RG semeada na segunda época, em função do pH do solo.	31
Tabela 4 - Número de legumes (NLP, planta ⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para a cultivar NA 5909RG, para primeira e segunda época de semeadura.	32
Tabela 5 - Número de legumes (NLP, planta ⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grãos (PG, kg ha ⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para a cultivar NS 6209RR, para primeira época de semeadura.	35
Tabela 6 - Pesos nos dois primeiros componentes principais das variáveis número de nódulos em R2 (NNP), massa seca de nódulos em R2 (MSN), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA), número de legumes (NLP), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) em função do momento de inoculação e pH do solo para as cultivares NA 5909RG e NS 6209RR, para primeira e segunda época de semeadura.	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA	13
2.2 TRATAMENTOS DE SEMENTES	15
2.3 pH DO SOLO.....	16
2.4 INOCULAÇÃO EM PRÉ-SEMEADURA.....	17
2.5 OSMOPROTETORES NA INOCULAÇÃO DE SEMENTES	18
CAPÍTULO I - INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO.....	20
INOCULATION OF SOYBEAN SEEDS COATED WITH OSMOPROTETOR IN DIFFERENT SOIL pH.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE	51

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada uma cultura de grande importância econômica devido ao fato de ser a oleaginosa mais consumida no mundo. Apresenta forte expansão de área cultivada, a qual foi impulsionada pela crescente demanda mundial por proteínas de origem animal. No Brasil a área cultivada com grãos, a de soja corresponde a 57%, sendo as principais regiões produtoras o Sul e Centro-Oeste. Na safra de 2015/2016 a área semeada no Brasil chegou ao seu recorde, passando dos 33 milhões de hectares e ultrapassando 95 milhões de toneladas produzidas. Porém, a produtividade média para a safra ficou abaixo do esperado, totalizando 2.882 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016). Atualmente é possível obter produtividades que ultrapassam 8.500 kg ha⁻¹ (CESB, 2015). Neste contexto, cresce a procura por práticas de cultivo capazes de promover um adequado estabelecimento e desenvolvimento da cultura no campo e, conseqüentemente, alcançar patamares maiores de produtividade. Contudo, a expressão do potencial produtivo dessa cultura depende de vários fatores como das condições do meio onde as plantas se desenvolvem e do correto manejo de adubação. Dentre as condições que está ao alcance do produtor solucionar, está a demanda de nutrientes, sendo um deles o nitrogênio (N).

O N deve ser suprido em quantidades suficientes para a planta, pois está associado ao crescimento vegetativo vigoroso e alta atividade fotossintética. Sua deficiência influencia no desenvolvimento das plantas, onde poucas flores desenvolvem-se e conseqüentemente menores produtividades são atingidas.

Na cultura da soja o fornecimento de N pode ser suprido por meio do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esse ocorre por meio de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que infectam as raízes da planta nos pêlos radiculares, formando os nódulos nos quais o nitrogênio atmosférico é convertido por bactérias a formas assimiláveis pela planta, nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺). Todavia, as bactérias desse gênero não estão naturalmente presentes em solos brasileiros, sendo necessária a realização do processo de inoculação, principalmente em áreas onde nunca foi realizado. No Brasil, as estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas e que possuem maior eficiência na FBN, para a cultura da soja, são *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5009) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) (CÂMARA, 2014).

A eficiência desse processo é dependente de fatores bióticos e abióticos, como da planta hospedeira, da simbiose entre a planta e a bactéria, de temperaturas altas, da acidez do solo, da baixa fertilidade do solo, da disponibilidade de água (HUNGRIA; VARGAS, 2000),

da presença de metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e da compatibilidade entre tratamento de sementes e inoculantes (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Quando possível esses fatores devem ser controlados para que sejam propiciadas condições adequadas para ocorrência da simbiose entre raízes e bactérias. Vale ressaltar, também, que durante o ciclo da cultura há constante formação e renovação dos nódulos no sistema radicular da planta, contribuindo para que o processo de formação até o estabelecimento da bactéria e realização da FBN seja bastante responsivo a diversos fatores do meio.

A prática de inoculação envolve organismos vivos que, quando expostos a condições desfavoráveis, podem perder sua viabilidade, como ocorre no caso do armazenamento de sementes já inoculadas e/ou com tratamento de sementes (fungicidas e inseticidas). Recomenda-se, assim, que a inoculação das sementes seja realizada no máximo até 24 h antes da semeadura, buscando manter o maior número de células viáveis da bactéria, assim aumentando as chances de ocorrência da simbiose (CAMPO et al., 2008). Esse processo acaba reduzindo a eficiência da semeadura devido ao tempo destinado para sua operação, além da necessidade de maior mão de obra, razão pelo qual os produtores podem deixar de realizá-la, ou fazê-la de forma inadequada, por temor de perder os dias com condições ideais que permitem a semeadura, principalmente em relação à umidade do solo. Portanto, há necessidade que a operação de inoculação das sementes possa ser realizada dias anteriores a semeadura, ou que venham pré-inoculadas, o que traria vantagens a logística do processo.

Nesse sentido, novas tecnologias que proporcionem melhores condições de sobrevivência da bactéria e que possam viabilizar a prática de inoculação antecipadamente ao dia de semeadura, podem ser utilizadas. Uma destas é por uso de osmoprotetores, que proporcionam a formação de uma “película” impedindo o contato direto do inoculante com o tratamento de sementes, disponibilizam substâncias sinalizadoras que beneficiam a comunicação entre as bactérias e as raízes da planta, além de fornecerem substratos que servem de alimento para as bactérias, portanto viabilizando uma maior sobrevivência dessas e, conseqüentemente, maior nodulação.

Além disso, é necessário que as plantas se desenvolvam em um ambiente adequado, principalmente, em relação à acidez do solo, a qual pode promover redução no desenvolvimento da planta, na multiplicação e sobrevivência do rizóbio e, conseqüentemente, na FBN.

Desta forma objetivou-se avaliar a viabilidade da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor, realizada em diferentes dias

pré-semeadura, e o efeito de diferentes condições de pH do solo sobre os componentes de produtividade, nodulação e produtividade de grãos da cultura da soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) transformou a inoculação com bactérias nas sementes de soja em uma necessidade tecnológica. Esta técnica permite garantir ganhos econômicos pela não utilização de fertilizantes nitrogenados, os quais implicam em gastos em torno de US\$ 10,3 bilhões de dólares (MENDES; HUNGRIA, 2014). Esse gasto elevado está relacionado com a eficiência de assimilação destes fertilizantes pelas plantas, que é em média 50%, devido à desnitrificação (redução do N pela ação dos microrganismos presentes no solo, em formas gasosas, N_2 e N_2O), lixiviação (lavagem no perfil do solo por escoamento superficial), volatilização (perdas gasosas na forma de NH_3) e imobilização microbiana (REIS JÚNIOR et al., 2011). Por estes motivos e devido à eficiência já comprovada da FBN na cultura da soja, esse vem sendo o processo mais utilizado para suprir as necessidades de N pela cultura.

A FBN é um processo de transformação do N gasoso na forma inorgânica combinada NH_3 e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas. A reação de redução do N_2 a NH_3 , a qual disponibiliza nitrogênio para as plantas, é realizada por microrganismos que contém a enzima nitrogenase e são conhecidos como fixadores de N_2 (EMBRAPA SOJA, 2011). Entre os sistemas agrícolas que contribuem para reciclagem de nitrogênio perdido para a atmosfera, o mais importante são as simbioses de bactérias com leguminosas, embora, outras associações menos específicas com cereais e gramíneas venham se destacando (SANTA et al., 2008).

Em leguminosas, como a soja, a FBN é realizada predominantemente por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, as quais se associam as raízes da planta, estabelecendo uma simbiose que resulta na formação de nódulos nestas raízes, possibilitando a obtenção de N que a cultura necessita para alta produtividade (ZILLI et al., 2008). Para que ocorra a formação do nódulo, primeiramente as raízes exsudam diversas moléculas (principalmente flavonóides). Essas têm a função de atrair os rizóbios, estimular o crescimento das bactérias na rizosfera da planta

hospedeira e ativar diversos genes da bactéria responsáveis pelo início da nodulação (DESBROSSES; STOUGAARD, 2011). Depois de ativados os genes para nodulação, denominados fatores *Nod*, estabelece-se um diálogo entre bactéria e raízes, ou seja, ocorre a infecção das raízes, ativando outros genes para formação do nódulo. Então esses reprogramam o desenvolvimento da célula cortical, ocasionando o encurvamento do pêlo radicular colonizado, denominado cordão de infecção. Esse então entra nas células epidêmicas da raiz. No interior do cordão de infecção as bactérias passam a se multiplicar, infeccionando as células radiculares, atingindo até camadas mais profundas como o periciclo da raiz. A presença desses cordões no parênquima cortical da raiz dá origem aos primórdios do nódulo, que com a ação dos hormônios auxinas e giberelinas, culminam na formação do nódulo, o qual vai abrigar a bactéria (HUNGRIA, VARGAS, ARAUJO, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os nódulos mantêm no seu interior o complexo enzima nitrogenase, que é formado por duas enzimas, a ferro proteína e a ferro-molibdênio proteína, as quais são responsáveis pela fixação de N no nódulo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No citoplasma das células nodulares infectadas também está presente a proteína leghemoglobina a qual se liga ao oxigênio, sendo capaz de armazenar O₂ suficiente para a manutenção da respiração celular por alguns segundos, além de fornecer ao nódulo coloração rosada no seu interior (EPSTEIN; BLOOM, 2005), indicando que esse está em plena atividade.

A visualização dos nódulos é possível a partir dos estádios fenológicos V1 e V2, conforme a escala fenológica proposta por Fehr e Caviness (1977), se ocorrer boa especificidade entre a bactéria e cultivar e as condições de ambiente e manejo forem favoráveis (CÂMARA, 2000). De V4 a V5, ocorre aumento na intensidade de nodulação, sendo que em R1 e R2 atinge-se o primeiro pico de nodulação, em resposta a alta atividade fotossintética, refletindo em menor abortamento das flores. O segundo pico da intensidade de nodulação é tingido entre R5.1 e R5.2, onde a demanda por nutrientes e energia é alta, pois está no início do enchimento de grão. Quando nos estádios finais de maturação da cultura, R7 e R8, as atividades de FBN são reduzidas e simultaneamente ocorre a diminuição da atividade dos nódulos e a degradação desses (CÂMARA, 2014; KOLLER; NYQUIST; CHORUSH, 1986).

No Brasil a inoculação, principalmente em áreas de primeiro cultivo, torna-se obrigatória, pois não existem rizóbios nativos capazes de nodular a soja de modo eficaz, por esta ser uma planta exótica no país (EMBRAPA, 2014). Estes rizóbios, inoculados via sementes, se multiplicam na rizosfera e nos nódulos e sobrevivem independentemente da

presença de seu hospedeiro simbiótico, mantendo-se uma população de bactérias numerosa no solo (WEAVER; FREDERICK, 1974).

Segundo Hungria, Campo e Mendes (2007), áreas onde já receberam inoculantes possuem a população de até 10^6 rizóbios por grama de solo, sendo possível a formação de nódulos pela população presente. Porém, não há um tempo determinado de sobrevivência destas bactérias no solo, pois é dependente de condições do meio. Em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica há uma redução na sobrevivência das bactérias. Isso decorre de altas temperaturas as quais ficam expostas e que acarretam em má formação e funcionamento dos nódulos e também pela baixa disponibilidade de carbono (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Apesar disso foi observada uma média de 8% de incremento na produtividade de grãos em áreas com populações já estabelecidas de *Bradyrhizobium* e que foram reinoculadas no Paraná (HUNGRIA et al., 2006).

Contudo, muitas vezes o sucesso na nodulação não é alcançado. Isso pode estar relacionado a fatores biológicos e químicos do solo, ou devido a problemas com o inoculante, com o processo da inoculação, ou com o tratamento de sementes (VIEIRA NETO et al., 2008).

2.2 TRATAMENTOS DE SEMENTES

A semente tem um importante papel no estabelecimento da lavoura, além de ser o mais importante veículo de disseminação e sobrevivência de muitos patógenos. Por isso, a utilização de tratamento de sementes se tornou uma prática indispensável, pois além de assegurar o estabelecimento da cultura, mediante o controle de patógenos transmitidos pela mesma, reduz ou previne a introdução e a disseminação destes na lavoura (DENARDIN, 2010). Atualmente, no Brasil, praticamente 100% das sementes de soja comercializadas passam por algum tipo de tratamento químico, sendo esta prática abrangentemente difundida (BAUDET; PESKE, 2006).

Contudo, na cultura da soja, onde se utiliza a inoculação das sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, um dos grandes desafios tem sido a manutenção das células bacterianas viáveis por mais tempo. Conforme Campo e Hungria (2000), a inoculação de semente, aliado à aplicação de tratamento de sementes e micronutrientes, é uma prática bastante utilizada que pode afetar a sobrevivência dos rizóbios e, conseqüentemente, reduzir a nodulação e a FBN. Trabalhos como os de Marks et al. (2013) e Rampim et al. (2015) têm

demonstrado que dentre os produtos utilizados o fungicida é o que apresenta maior incompatibilidade com as bactérias da inoculação das sementes.

Segundo Bikrol et al. (2005) e Costa et al. (2013), a utilização de fungicidas no tratamento de sementes pode proporcionar uma redução no número e massa seca de nódulos, afetando, assim, a FBN. Isso decorre do fato que os fungicidas apresentam diferentes níveis de toxicidade, reduzindo o número de células viáveis do inoculante. O tratamento com fungicidas imediatamente antes da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium* pode acarretar redução da nodulação superior a 80% e por consequência da produtividade de grãos que pode sofrer reduções de até 20%, dependendo da textura do solo, do ingrediente ativo do produto e do histórico de cultivo das áreas (CAMPO et al., 2009; ZILLI et al., 2009). Por outro lado, em áreas onde já existem populações estabelecidas de *Bradyrhizobium*, não se têm observado efeitos negativos sobre a nodulação das plantas de soja (COSTA et al., 2013).

Considerando a importância da integração do tratamento de sementes de soja com fungicidas e a inoculação das sementes com o *Bradyrhizobium*, algumas medidas são indispensáveis para minimizar o efeito negativo sobre as bactérias para garantir patamares mais elevados de FBN e a sanidade das sementes. Uma das medidas mais eficazes conhecidas até então são aumentar a dose do inoculante, garantindo maior número de bactérias viáveis junto à semente ou aplicar o inoculante no sulco de semeadura, evitando o contato direto das células bacterianas com o fungicida (CAMPO et al., 2010). Outra alternativa é a utilização de osmoprotetores, que possuem uma capacidade de acelerar a formação dos nódulos e também agem formando um revestimento sobre a semente (SCOTT, 1989).

2.3 pH DO SOLO

Dentre os fatores abióticos que afetam a FBN, o pH do solo tem importância. O pH pode afetar a simbiose tanto em condições de baixo ou de alto níveis no solo, variando a tolerância de acordo com a espécie e a estirpe que for utilizada (BALA; GILLER, 2006; SHAMSELDIN, 2007).

Solos cultivados intensivamente com a cultura da soja e aliado ao manejo inadequado, tem provocado reduções dos teores de matéria orgânica e aumento da acidez do solo (HENNING et al., 1997). Em solos de regiões tropicais e subtropicais a acidez do solo é um dos principais fatores que limitam o crescimento das plantas, pois esses, normalmente, possuem baixa fertilidade natural, com pH em níveis críticos, destacando-se a presença de

manganês, ferro e alumínio, que são tóxicos para a maioria das culturas de interesse econômico (ALVA et al., 1988; SOUZA et al., 2010) e menores teores de fósforo, cálcio e magnésio (FIGUEIREDO et al., 2008). Sendo o pH do solo de referência para a cultura da soja de 6,0, porém a acidez vai limitar pouco a produtividade até pH de 5,5 (CQFS, 2016).

A acidez do solo, para essa cultura promove redução no desenvolvimento da planta, pois atua de forma negativa nas atividades do microssimbionte (rizóbios) que, geralmente, é a parte mais sensível ao efeito do pH (DEKA; AZAD; PATRA, 2006). Essa situação dificulta a troca de sinais entre esses e as raízes da planta (RUFINI et al., 2011), limitando sua sobrevivência e multiplicação e, conseqüentemente, reduzindo a nodulação e FBN (ESPAÑA; CABRERA-BISBAL; LÓPEZ, 2006). Portanto, o estágio inicial de infecção é o mais afetado. O pH ótimo para crescimento dos rizóbios é entre 6,0 e 7,0 (JORDAN, 1984) e poucos sobrevivem a pH abaixo de 5,0 (GRAHAM; VANCE, 2000).

Portanto, é importante a realização da análise de solo e, caso necessário, efetuar a correção do pH, com objetivo de fornecer melhores condições para sobrevivência e multiplicação dos rizóbios.

A correção do pH do solo pode ser realizada por meio de calagem, que além de corrigir a acidez do solo e reduzir a toxidez de alumínio, aumenta a disponibilidade de alguns micronutrientes (SILVA; MENDONÇA, 2007), como o magnésio para a produção de fotoassimilados e para a molécula de clorofila, além do cálcio para o crescimento radicular. Também promovem um melhor aproveitamento de N, fósforo e potássio pela cultura da soja (QUAGGIO et al., 1993), o que geralmente incrementa a nodulação, a FBN e, conseqüentemente, a produção da soja (TANAKA; MASCARENHAS, 1992).

2.4 INOCULAÇÃO EM PRÉ-SEMEADURA

A inoculação de sementes imediatamente antes da semeadura reduz a necessidade de prolongamento da vida útil do inoculante. Porém, produtores muitas vezes deixam de realizá-la ou a fazem inadequadamente, pois esta demanda tempo e exige mão de obra, acarretando em perda de tempo, principalmente para a operação de semeadura. Portanto, há uma clara necessidade pelos agricultores por sementes que já venham inoculadas industrialmente, ou que possam ser inoculadas dias anteriores a semeadura (HARTLEY; GEMELL; DEAKER, 2012). Além disso, a inoculação de sementes realizada industrialmente seja sob demanda após a venda das sementes (inoculação sob encomenda), ou antes, da venda

(sementes inoculadas na indústria), fornece aos agricultores um produto com melhor qualidade e padronização dos tratamentos aplicados, pronto para a semeadura.

A pré-inoculação de sementes apresenta desafios científicos, tecnológicos e comerciais significativos que devem ser superados para atender à crescente necessidade de novos tratamentos de sementes. Um desses está relacionado com a sobrevivência dos rizóbios, a qual é reduzida quando expostos a temperaturas altas (INDRASUMUNAR; DART; MENZIES, 2011), sendo recomendado o armazenamento das sementes, a uma temperatura de no máximo 30 °C e de preferência abaixo de 20 °C (PENNA et al., 2011). Essa ainda afeta diretamente a condição de umidade, proporcionando uma condição de estresse para a população bacteriana (STREETER, 2007). Outro importante fator que afeta a sobrevivência dessas é a incompatibilidade entre tratamento de sementes e inoculantes (SILVA et al. 2011), sendo esse como citado em tópico anterior, uma tecnologia indispensável para um melhor estabelecimento de plantas nas lavouras.

Contudo, Zilli, Campo e Hungria (2010), estudando a possibilidade de pré-inoculação de sementes, indicam ser possível realizá-la até cinco dias anteriores a semeadura, porém neste experimento não houve a utilização de tratamento de sementes (inseticida + fungicida). Já em Fipke et al. (2015), os resultados indicaram ser possível, a antecipação da inoculação em até sete dias anteriores a semeadura, com utilização do tratamento de sementes (fungicida + inseticida) juntamente com o osmoprotetor, sem prejuízos a produtividade da cultura. Permitindo assim uma maior logística na operação de semeadura, sem prejuízos a nodulação da cultura da soja.

2.5 OSMOPROTETORES NA INOCULAÇÃO DE SEMENTES

Novas tecnologias e formulações de produtos com intuito de manter a sobrevivência de bactérias de *Bradyrhizobium* sp., nas inoculações vem sendo estudadas (CAMPO et al., 2010; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015). Uma destas é por meio do revestimento de sementes com osmoprotetores, também conhecida como peliculização ou “filmcoating”, que consiste na deposição de uma camada fina e uniforme de um polímero à superfície da semente, podendo ser utilizado juntamente com o tratamento químico e biológico sem afetar a germinação destas (SCOTT, 1989).

Os polímeros apresentam propriedades protetoras, sendo atribuídas a esses a capacidade de reduzir os efeitos das flutuações de umidade relativa, prolongando a

sobrevivência dos rizóbios (DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007). Quando utilizados juntamente com o tratamento de sementes podem também trazer melhorias na uniformidade de distribuição de fungicidas sobre a superfície das sementes, aumentando sua retenção (REICHENBACH, 2004), minimizando os riscos de fitotoxidez ocasionados pelo tratamento de sementes e promovendo maior fixação destes produtos sobre elas (PIRES; BRAGANTINI; COSTA, 2004).

Além disso, os osmoprotetores fornecem substrato (solução açucarada) para a sobrevivência do inóculo durante o período de tempo que antecede a simbiose e disponibilizam substâncias que atuam na expressão gênica em prol da formação do nódulo, acelerando o processo de reconhecimento entre bactérias e raízes (SUGAWARA et al., 2006). Há também aditivos celulares em sua composição, os quais permitem maior concentração de microorganismos vivos nas sementes durante o processo de inoculação (MARKS et al., 2013). Além de não afetarem na qualidade fisiológica das sementes (CONCEIÇÃO et al., 2014; PEREIRA et al., 2010).

Dentro desse contexto o uso de um produto inerte como o osmoprotetor, após o tratamento de sementes e anterior a inoculação, poderia ser uma alternativa viável na manutenção da sobrevivência das bactérias, permitindo que a prática de inoculação possa ser realizada em antecedência a semeadura.

CAPÍTULO I - INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA REVESTIDA COM OSMOPROTETOR EM DIFERENTES pH DO SOLO

RESUMO - A utilização de inoculantes com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* é uma tecnologia indispensável para aumentar a produtividade da cultura da soja. Entretanto, alguns fatores como tempo de inoculação até a semeadura, tratamento químico de sementes e o pH do solo podem afetar a sobrevivência destas bactérias. Assim, objetivou-se avaliar a viabilidade da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor, realizada em diferentes dias pré-semeadura, e o efeito de diferentes pH do solo sobre os componentes de produtividade, nodulação e produtividade de grãos da cultura da soja. O estudo foi realizado à campo, em duas épocas distintas. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com quatro repetições. Foram semeadas duas cultivares de soja (NA 5909RR e NS 6209RR) em cada época de semeadura. Essas foram submetidas a dois pH do solo (5,3 e 6,5) e inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor (no dia, 4 e 11 dias anteriores à semeadura, para a primeira época; no dia, 7 e 14 dias anteriores à semeadura, para a segunda época). As avaliações realizadas foram dos componentes de nodulação e de produtividade, massa seca de parte aérea e produtividade de grãos. Na cultivar NA 5909RR, em solo com pH 5,3, as sementes inoculadas com *Bradyrhizobium* juntamente com osmoprotetor, aos quatro e sete dias pré-semeadura, apresentaram um acréscimo de 10,8% e 8,3% de produtividade quando comparados aos tratamentos realizados nos mesmos dias sem osmoprotetor. O osmoprotetor juntamente com a inoculação de *Bradyrhizobium* permitiu maior número e massa seca de nódulos em solo com pH mais ácido. O solo com menor condição de acidez foi responsável por maior produtividade de grãos, comparado ao de maior acidez, quando ambos não receberam inoculação das sementes. A variável com maior poder de explicação e contribuição na variabilidade existente nos dados do experimento foi a produtividade de grãos.

Palavras - chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Fixação biológica de nitrogênio. Sobrevivência. Inoculação antecipada.

INOCULATION OF SOYBEAN SEEDS COATED WITH OSMOPROTETOR IN DIFFERENT SOIL pH

ABSTRACT - The use of inoculants with nitrogen-fixing bacteria of the *Bradyrhizobium* genus is an indispensable technology to increase the productivity of the soybean crop. However, factors such as inoculation time to sowing, chemical seed treatment and soil pH may affect the survival of these bacteria. The objective of this study was to evaluate the viability of the inoculation with *Bradyrhizobium* bacteria associated to the osmoprotective coating on different pre-sowing days and the effect of different soil pH on the productivity, nodulation and grain yield components of the crop of soybeans. The study was carried out in the field, in two different epochs. A randomized block design with four replications was used. Two soybean cultivars (NA 5909RR and NS 6209RR) were sown at each sowing season. These were submitted to two soil pH (5.3 and 6.5) and inoculation with *Bradyrhizobium* bacteria associated to the osmoprotective coating (at day 4 and 11 days before sowing, for the first season; And 14 days prior to sowing, for the second season). The evaluations were of nodulation and productivity components, shoot dry mass and grain yield. In the cultivar NA 5909RG, in soil with pH 5.3, the seeds inoculated with *Bradyrhizobium* together with the osmoprotetor at the four and seven days pre-sowing presented an increase of 10.8% and 8.3% of productivity when compared to the treatments Performed on the same days without the osmoprotectant. The osmoprotetor together with the *Bradyrhizobium* inoculation allowed a greater number and dry mass of nodules in soil with more acidic pH. Soil with lower acidity condition was responsible for higher grain yield, compared to the higher acidity, when both were not inoculated. The variable with greater explanatory power and contribution in the variability in the data of the experiment was grain yield.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. Biological fixation of nitrogen. Survival. Anticipated inoculation. Acidity of soil.

INTRODUÇÃO

A expressão do potencial produtivo da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) depende das condições do meio onde as plantas se desenvolvem e do correto manejo de adubação. Dentre as condições está a grande demanda de nutrientes, especialmente de nitrogênio (N). Estima-se que para produzir 1.000 kg de grãos de soja são necessários aproximadamente 80 kg de N (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A necessidade de N, nessa cultura, pode ser suprida pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa ocorre por meio de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que se associam ao sistema radicular da planta, estabelecendo uma simbiose, resultando na formação de nódulos (ZILLI et al., 2008). Para formação desses, primeiramente as raízes exsudam diversas moléculas (principalmente, flavonóides) que atraem os rizóbios, estimulando o crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e ativando diversos genes da bactéria responsáveis pelo início da nodulação (DESBROSSES; STOUGAARD, 2011). Depois de ativados esses genes, denominados fatores *Nod*, estabelecem a simbiose entre bactéria e raízes, ativando outros genes e desencadeando processos que permitem a bactéria penetrar na raiz, realizando assim sua infecção e provocando o crescimento das células do córtex da planta hospedeira, até a formação do nódulo o qual vai abrigar a bactéria (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os nódulos bacterianos, provenientes da inoculação, ocorrem mais intensivamente na coroa da raiz, concentrando-se preferencialmente na raiz principal do que nas raízes secundárias (CÂMARA, 2014). A bactéria já presente no interior do nódulo, então rompe a ligação tripla do dinitrogênio (N_2) e o transforma em formas assimiláveis pelas plantas, nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Essa associação permite a fixação de nitrogênio de até 300 kg de N por hectare, fornecendo 94% do N total que a planta precisa no seu ciclo (CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009). Portanto, a FBN é indispensável para competitividade da soja, resultando em incrementos na produtividade de grãos da cultura.

No entanto, a eficiência da FBN é dependente de alguns fatores bióticos e abióticos, como da planta hospedeira, simbiose entre planta e bactéria, temperaturas altas (INDRASUMUNAR; DART; MENZIES, 2011), acidez, baixa fertilidade e disponibilidade de água do solo (HUNGRIA; VARGAS, 2000, MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, SINCLAIR; PURCELL; KING, 2007), compatibilidade entre tratamento de sementes e inoculantes

(SILVA et al. 2011) e competição entre estipes nativas e selecionadas (CHUEIRI; PAJARA; BOZZA, 2005).

A temperatura de armazenamento das sementes após a inoculação é o fator que mais afeta a sobrevivência das bactérias (VRIEZEN; DE BRUIJN; NÜSSLEIN, 2006), sendo recomendado o armazenamento das sementes, a uma temperatura de no máximo 30 °C e de preferência abaixo de 20 °C (PENNA et al., 2011). Além disso, afeta diretamente a condição de umidade, proporcionando uma condição de estresse para a população bacteriana (ONUH; DONALD, 2009).

O tratamento de sementes com fungicidas apresentam diferentes níveis de toxicidade, reduzindo o número de células do inoculante, e, portanto, o número de nódulos nas raízes (PEREIRA et al., 2009; MENTEN; HELOISA; MORAES, 2010). Quando realizado imediatamente antes da inoculação das sementes com *Bradyrhizobium* pode acarretar redução da nodulação superior a 80% e, por consequência, da produtividade de grãos de até 20%, dependendo da textura do solo, do ingrediente ativo do produto e do histórico de cultivo das áreas (CAMPO et al., 2009; ZILLI et al., 2009). Por outro lado, em áreas onde já existem populações estabelecidas da bactéria, não têm-se observado efeitos negativos do tratamento de sementes com fungicidas sobre a nodulação das plantas de soja (COSTA et al., 2013). Isso ocorre, pois áreas onde já receberam inoculantes possuem a população de até 10^6 rizóbios por grama de solo, sendo possível a formação de nódulos pela população presente, e quando reinoculadas é possível 8% de incremento na produtividade de grãos (HUNGRIA et al., 2006).

Em relação ao pH solo, a planta de soja desenvolve-se normalmente em solos com pH de referência 6,0, porém a acidez vai limitar pouco a produtividade quando até pH de 5,5 (CQFS, 2016). A acidez do solo promove redução no seu desenvolvimento, pois esses possuem baixa fertilidade natural, com pH em níveis críticos, destacando-se a presença de manganês, ferro e alumínio, que são tóxicos para a maioria das culturas de interesse econômico (ALVA et al., 1988; SOUZA et al., 2010) e menores teores de fósforo, cálcio e magnésio (FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, atua de forma negativa nas atividades do microssimbionte (rizóbios) que é a parte mais sensível ao efeito do pH (DEKA; AZAD; PATRA, 2006), dificultando a troca de sinais entre esses e as raízes da planta (RUFINI et al., 2011), limitando sua sobrevivência e multiplicação e, conseqüentemente, reduzindo a nodulação e FBN (ESPAÑA; CABRERA-BISBAL; LÓPEZ, 2006).

Solos com pH corrigidos possuem menor acidez, toxidez de alumínio e maior disponibilidade de alguns micronutrientes do solo (SILVA; MENDONÇA, 2007), como o

magnésio para a produção de fotoassimilados e para a molécula de clorofila, além do cálcio para o crescimento radicular. Além de promoverem um melhor aproveitamento de N, fósforo e potássio pela cultura da soja (QUAGGIO et al., 1993), o que geralmente incrementa a nodulação e conseqüentemente a FBN (TANAKA; MASCARENHAS, 1992).

Portanto, considerando as dificuldades de sobrevivência das bactérias, recomenda-se para que seja alcançado o número suficiente de células viáveis por semente de soja, de 1.200.000, que a semeadura seja efetuada no máximo 24 h após a inoculação (CAMPO et al., 2008). Períodos mais longos, na ordem de semanas, podem reduzir a sobrevivência das bactérias entre 70 e 90% do valor que se tinha em 24 h (DEAKER; HARTLEY; GEMELL, 2012). Todavia, o tempo destinado a essa operação reduz a eficiência da semeadura, além da necessidade de maior mão de obra e de equipamentos, nem sempre disponíveis aos produtores, fazendo com que muitos deixem de realizá-la ou a façam inadequadamente. Essa situação tem aumentado a demanda dos produtores por tecnologias que visem maior efetividade do processo, como a obtenção de sementes inoculadas diretamente da indústria, ou que possam ser inoculadas dias anteriores a semeadura. Além disso, a inoculação de sementes realizada industrialmente forneceria vantagens, como melhor uniformidade do recobrimento das sementes.

Considerando a importância do tratamento de sementes, de um ambiente favorável a sobrevivência dos rizóbios e também a necessidade de viabilizar o processo de inoculação, algumas medidas são indispensáveis de modo a garantir os patamares mais elevados de FBN e a sanidade das sementes. Uma das medidas é aumentar a dose do inoculante, garantindo maior número de bactérias viáveis junto à semente, principalmente em áreas novas ou solos com acidez elevada, ou aplicar o inoculante no sulco de semeadura, evitando o contato direto das células bacterianas com o fungicida (CAMPO et al., 2010). Mais recentemente, especialmente quando ocorrem limitações a inoculação nas sementes, tem-se utilizado a inoculação por pulverização, sem prejuízos a FBN (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

Outra alternativa no tratamento de sementes é por meio do uso de osmoprotetores, pois esses possuem polímeros que proporcionam a formação de uma película impedindo o contato direto do inoculante com o tratamento de sementes e reduzem os efeitos das flutuações de umidade relativa (DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2007). Além disso, fornecem substrato para a sobrevivência da bactéria durante o período que antecede a simbiose, disponibilizam substâncias que atuam na comunicação entre plântula e bactéria com intuito de acelerar a formação do nódulo nas raízes da planta, e proporcionam maior uniformidade a inoculação, não prejudicando a qualidade e o desempenho das sementes (BAYS et al., 2007;

MARKS et al., 2013; PEREIRA et al., 2010). Resultados, com realização de inoculação juntamente com o osmoprotetor e tratamento de sementes (fungicida + inseticida), dias anteriores a semeadura, sem prejuízos na produtividade da cultura da soja, permitiram a antecipação da inoculação em sete dias (FIPKE, 2015).

Desta forma, objetivou-se avaliar a viabilidade da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associadas ao revestimento com osmoprotetor, realizada em diferentes dias pré-semeadura, e o efeito de diferentes pH do solo sobre os componentes de produtividade, nodulação e produtividade de grãos da cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido à campo, na área experimental do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais, localizada no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na latitude 29°43'2.81" S, longitude 53°43'58.28" O em uma altitude de 116 metros. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa (PEELL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007) tendo como características climáticas principais a temperatura média do mês mais quente 24,8 °C e a temperatura média do mês mais frio de 14,1 °C (HELDWEIN; BURIOL; STRECK, 2009).

O solo da área é classificado como Argissolo Vermelho distrófico arênico (EMBRAPA, 2013). A análise química após a correção indica que o solo apresenta como características: solo com pH (água, 1:1) = 5,3; matéria orgânica (% m/v) = 2,9; argila (% m/v) = 27; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 2,1; potássio (cmolcdm⁻³) = 0,031; H + Al (cmolcdm⁻³) = 3,1; CTC (pH 7, cmolcdm⁻³) = 10,9; saturação de bases (%) = 71,8. Solo com pH (água, 1:1) = 6,5; matéria orgânica (% m/v) = 2,7; argila (% m/v) = 29; fósforo, P-Mehlich (mg dm⁻³) = 3,3; potássio (cmolcdm⁻³) = 0,041; H + Al (cmolcdm⁻³) = 2,5; CTC (pH 7, cmolcdm⁻³) = 11,9; saturação de bases (%) = 79,3.

O trabalho foi realizado com as semeaduras da primeira e segunda época em 19 de outubro e 17 de dezembro de 2015, respectivamente. Foram conduzidos quatro experimentos, no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições. Dois com a cultivar NA 5909RG, a qual possui hábito de crescimento indeterminado, GMR = 5.9, flores roxas, pubescência cinza e sementes com hilo preto imperfeito e dois com a cultivar NS 6209RR que apresenta hábito de crescimento determinado, GMR = 6.2, flores roxas, pubescência cinza e sementes

com hilo marrom claro, ambas com alto potencial de ramificação (NIDERA SEMENTES LTDA, Registro nº 24590 e nº 29989, respectivamente).

Os tratamentos foram compostos por um modelo bifatorial (2 x 7), sendo os fatores constituídos por dois pH de solo (5,3 e 6,5) e sete tratamentos de sementes (TS: somente tratamento de semente (TS); TSB0: TS + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TSB4: TS + inoculação com *Bradyrizobium*, quatro dias antes da semeadura; TSB11: TS + inoculação com *Bradyrizobium*, onze dias antes da semeadura; TSBO0: TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TSBO4: TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, quatro dias antes da semeadura; TSBO11: TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, onze dias antes da semeadura), para a primeira época de semeadura. Para a segunda época as inoculações foram realizadas aos sete e quatorze dias anteriores à semeadura, alterando-se os tratamentos TSB4, TSB11, TSBO4 e TSBO11. Cada unidade experimental foi constituída de 7,75 m de comprimento por 2,25 m de largura, com cinco fileiras espaçadas 0,45 m, totalizando 17,4 m² de área total e 6,75 m² de área útil.

A área dos experimentos permaneceu em pousio durante o período de inverno, sendo manejada com roçadas mensais para evitar a reprodução de plantas daninhas na área. A adubação foi realizada a partir do resultado da análise química do solo da área, sendo corrigido o pH para 5,3 e 6,5. Os macronutrientes P₂O₅ e K₂O foram fornecidos no sulco de semeadura, na dose de 400 kg ha⁻¹ da fórmula 00-23-30, com utilização de semeadora adubadora. A densidade de semeadura utilizada foi de 33 plantas m². O manejo de pragas, doenças e plantas daninhas foi realizado conforme as indicações Técnicas para a Cultura da Soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2014/2015 e 2015/2016 (EMBRAPA, 2014) e necessidades da cultura.

No tratamento químico das sementes foi utilizada a mistura de fungicida + inseticida: Piraclostrobina 25g i.a L⁻¹ + Tiofanato metílico 225g i.a L⁻¹ + Fipronil 250g i.a L⁻¹ (Standak[®] Top) na dose 2 mL kg⁻¹ de sementes. Para recobrimento das sementes foi utilizado 6 mL kg⁻¹ de sementes de um osmoprotetor (água, extrato metabólico de bactérias, complexo de açúcares e biopolímeros). A inoculação foi realizada com inoculante turfoso, na dose de 4 g kg⁻¹ de sementes, a base da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* (água, extrato de levedura, glicerol, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio e turfa, contendo uma concentração de 5,5 x 10⁹ UFC g⁻¹ de bactérias fixadoras de N).

Quando as plantas atingiram o estágio fenológico R2 (pleno florescimento, uma flor aberta num dos dois últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida), conforme a

escala fenológica proposta por Fehr e Caviness (1977), foi realizada a contagem de nódulos das raízes. Para essa avaliação foram coletadas, aleatoriamente, quatro plantas de cada unidade experimental. As plantas foram coletadas com o cuidado de manter o volume de solo pré-estabelecido para cada planta de $0,008 \text{ m}^3$ com dimensões de $0,2 \text{ (L1)} \times 0,2 \text{ (L2)} \times 0,2 \text{ (H)}$ coletadas com auxílio da pá-de-corte, centralizando duas plantas no quadro $0,2 \text{ (L1)} \times 0,2 \text{ (L2)} \text{ m}$. O número de nódulos foi determinado pela contagem direta de nódulos na raiz principal e secundárias de cada planta (NNP, planta⁻¹). Após a contagem realizou-se a lavagem dos nódulos com posterior secagem dos mesmos em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 48 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas da estufa e pesadas, determinando-se a massa seca de nódulos por planta (MSN, mg planta⁻¹). As partes aéreas destas mesmas plantas coletadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 48 horas e, após este período, as amostras foram retiradas da estufa e pesadas para obtenção da massa seca de planta (MSPA, g planta⁻¹).

Na maturação plena da cultura (R8) foram coletadas cinco plantas, em sequência na fileira de cultivo, a partir do início da área útil da unidade experimental para a determinação do número de legumes por planta (NLP, planta⁻¹). Também em R8, foram colhidos cinco metros das três fileiras centrais da unidade experimental ($6,75 \text{ m}^2$), a qual representa sua área útil. Após a colheita, as amostras foram trilhadas e limpas para a aferição e correção da umidade dos grãos (base 13%) e obtenção da produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) e massa de mil grãos (MMG, g).

Os dados foram testados para atendimento às pressuposições do modelo matemático (STEEL; TORREI; DICKEY, 1997) e então submetidos a análise de variância (teste F). As médias foram submetidas à procedimentos complementares de acordo com as respostas apresentadas pela interação. As médias foram comparadas pelo teste de Scott – Knott em nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011).

Foi realizada, também, a análise multivariada por meio dos componentes principais (CRUZ et al., 2013). Esta teve o intuito de indicar quais foram as variáveis observadas no estudo que explicaram a maior percentagem da variação total existente nos dados. A escolha dos componentes foi de acordo com o critério de 70% de explicação da variabilidade total. Para a análise foi utilizado o software estatístico GENES.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas épocas de semeadura, para a cultivar NA 5909RG, na análise de variância houve interação dupla significativa (tratamentos x pH) para as variáveis NNP, MNP, MSPA, NLG, MMG e PG, com exceção do NNP e MSN na segunda época. Para a cultivar NS 6209RR a interação dupla significativa foi observada para as variáveis NNP, MNP e PG, na primeira época e MNP, MSPA e NLG, na segunda época (APÊNDICE). Sendo necessário o estudo dos efeitos principais quando não houve interação significativa.

Em ambas cultivares e pH solo, na primeira época de semeadura, observa-se que as raízes das plantas que continham nódulos com tamanhos menores (relação MSN e NNP), foram as que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O maior número de nódulos de tamanhos menores permitiria uma maior área de raízes infectadas. O tratamento TSBOO foi o que apresentou um maior NNP para todas as situações avaliadas. Sendo esse também o que apresentou maior MSN no pH 5,3 (Tabela 1 e Tabela 2). Isso mostra vantagens dos tratamentos em que se utiliza osmoprotetor, principalmente, no dia de semeadura, pois em solos com pH baixo a presença de bactérias, como o *Bradyrhizobium*, fica limitada. Sendo que o pH ótimo para crescimento dos rizóbios fica entre 6,0 e 7,0 (JORDAN, 1984). Além disso, o osmoprotetor possui complexo de açúcares e disponibiliza substâncias que atuam na expressão gênica em prol da formação do nódulo (SUGAWARA et al., 2006), os quais, respectivamente, ajudam a manter a sobrevivência dos rizóbios e aceleram o reconhecimento dos rizóbios e raízes, pois atuam na síntese de nodulinas, proteínas que são importantes na formação e manutenção do nódulo (ALMARAZ et al., 2007). O que pode ter sido favorável nos solos com pH mais ácido, pois esses dificultam a troca de sinais entre raízes e bactérias, limitando sua sobrevivência e multiplicação (DUZAN et al., 2004; ESPAÑA; CABRERA-BISBAL; LÓPEZ, 2006).

Tabela 1 - Número de nódulos em R2 (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta⁻¹), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para a cultivar NA 5909RG, para primeira e segunda época de semeadura.

Cultivar NA 5909RG						
TRATAMENTOS ¹	NNP		MSN (mg)		MSPA (g)	
	pH		pH		pH	
	5,3	6,5	5,3	6,5	5,3	6,5

Primeira época de semeadura						
TS	90,8bA*	107,9bA	574,7bA	596,5bA	12,4cA	11,6aA
TSB0	107,5bB	139,0aA	558,1bB	657,0aA	13,6bA	14,4aA
TSB4	124,5bA	93,8bB	480,2cA	482,7cA	11,5cA	13,4aA
TSB11	98,6bA	104,5bA	435,7cB	577,8bA	11,1cA	12,3aA
TSBO0	178,2aA	147,1aB	752,6aA	500,7cB	16,7aA	11,6aB
TSBO4	111,0bA	140,0aA	501,6cA	521,7cA	9,7cB	12,9aA
TSBO11	99,5bA	124,8aA	470,6cB	554,5cA	10,6cA	10,2aA
Média	119,3		547,4		12,2	
CV %	14,7		7,2		11,8	
Segunda época de semeadura						
TS	- ²	-	173,8bA	187,9aA	-	-
TSB0	-	-	192,6bA	149,5bA	-	-
TSB7	-	-	135,5bB	211,0aA	-	-
TSB14	-	-	250,0aA	204,4aA	-	-
TSBO0	-	-	235,7aA	166,0bB	-	-
TSBO7	-	-	158,5bA	115,5bA	-	-
TSBO14	-	-	230,5aA	154,3bB	-	-
Média			183,2			
CV %			20,8			

¹Tratamentos: TS: somente tratamento de semente; TS + I (0): TS + inoculação com *Bradyrhizobium*, no dia da semeadura; TS + I (4): TS + inoculação com *Bradyrhizobium*, 4 dias antes da semeadura (DAS); TS + I (11): TS + inoculação com *Bradyrhizobium*, 11 DAS; TS + O + I (0): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrhizobium*, no dia da semeadura; TS + O + I (4): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrhizobium*, 4 DAS; TS + O + I (11): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrhizobium*, 11 DAS. Para a segunda época as inoculações foram realizadas aos sete e quatorze DAS, alterando-se os tratamentos T3, T4, T6 e T7. ²Não houve interação significativa entre os fatores. *Letras maiúsculas distintas na linha e letras minúsculas distintas na coluna os tratamentos diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Na cultivar NS 6209 RR, em pH 6,5, o TSBO0, não diferiu do TSBO4 e TSB4, para as variáveis NNP e MSN. Quanto a MSN também não houve diferença para o TSB0. Na NA 5909RG, o TSBO0 não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos em que se utilizou osmoprotetor e do TSB0 (Tabela 1 e Tabela 2). No tratamento de sementes foi utilizado fungicida e sua aplicação pode reduzir significativamente a população de *Bradyrhizobium* devido ao seu princípio ativo, pH e solventes utilizados nas formulações (ANNAPURNA, 2005; CAMPO et al., 2009). Portanto, diminuindo o número de células viáveis a realizar a simbiose com as raízes das plantas e conseqüentemente a nodulação (SANTOS et al., 2013; COSTA et al., 2013), provavelmente, ocorrendo com maior intensidade nos tratamentos inoculados dias anteriores a semeadura pelo maior tempo de contato com as bactérias.

Em experimento conduzido por Zilli, Campo e Hungria (2010), com inoculação em pré-semeadura e sem utilização de fungicida no tratamento de sementes também obtiveram redução no número e massa seca de nódulos, não ocorrendo redução na inoculação padrão

(realizada no dia de semeadura). Para Fipke (2015), em trabalho com utilização de tratamento de sementes juntamente com osmoprotetor maiores NNP foram observados na presença de osmoprotetor. Em vista disto, percebe-se que o osmoprotetor pode ter agido de forma a evitar o contato direto das bactérias com o fungicida, pois a presença de polímeros em sua constituição minimizam os riscos de fitotoxidez ocasionados pelo tratamento de sementes, por meio da formação de uma película (PIRES; BRAGANTINI; COSTA, 2004), permitindo uma maior sobrevivência das bactérias (HARTLEY; GEMELL; DEAKER, 2012; MARKS et al., 2013) e conseqüentemente maior nodulação.

Tabela 2 - Número de nódulos em R2 (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulos em R2 (MSN, mg planta⁻¹) e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹) para a cultivar NS 6209RR em função do momento de inoculação das sementes da soja, para primeira e segunda época de semeadura.

Cultivar NS 6209RR						
TRATAMENTOS ¹	NNP		MSN (mg)		MSPA (g)	
	pH		pH		pH	
	5,3	6,5	5,3	6,5		
Primeira época de semeadura						
TS	131,1bA*	107,5bA	557,5bA	488,5bA	14,9 ^a	
TSB0	154,8Aa	123,5bA	569,3bA	566,7aA	16,8 ^a	
TSB4	126,5Ba	146,1aA	522,5bA	608,2aA	15,4 ^a	
TSB11	112,8Ba	101,7bA	432,6cA	455,3bA	13,7b	
TSBO0	166,6aA	158,7aA	658,6aA	632,7aA	12,9b	
TSBO4	94,4bB	150,2aA	445,0cB	676,4aA	13,8b	
TSBO11	131,1bA	107,5bA	557,5bA	488,5bA	14,4b	
Média	130,6		543,6		14,5	
CV %	14,5		10,5		10,6	
Segunda época de semeadura						
TS	²	-	190,8bA	164,1aA	-	-
TSB0	-	-	163,1bA	177,2aA	-	-
TSBO0	-	-	138,6bA	179,2aA	-	-
TSBO7	-	-	211,3bA	189,1aA	-	-
TSBO14	-	-	323,1aA	204,6aB	-	-
Média			194,1			
CV %			22,2			

¹Tratamentos: TS: somente tratamento de semente; TS + I (0): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TS + I (4): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 dias antes da semeadura (DAS); TS + I (11): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS; TS + O + I (0): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TS + O + I (4): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 DAS; TS + O + I (11): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS. Para a segunda época as inoculações foram realizadas aos sete e quatorze DAS, alterando-se os tratamentos T3, T4, T6 e T7. ²Não houve

interação significativa entre os fatores. *Letras maiúsculas distintas na linha e letras minúsculas distintas na coluna os tratamentos diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Quanto a MSPA, para ambas as cultivares, semeadas na segunda época, em solo com pH 6,5, as plantas apresentaram maior MSPA em relação as semeadas em solo com pH 5,3 (Tabela 3). Isso pode ter ocorrido devido a planta de soja ser sensível a acidez do solo, a qual influencia na redução do seu desenvolvimento (DEKA; AZAD; PATRA, 2006), interferindo diretamente na massa seca de parte aérea. Trabalho realizado por Rufini (2010), também obteve-se maiores acúmulos de biomassa das plantas de feijoeiro-comum no solo onde foi realizada calagem.

Em solo com pH 5,3, para cultivar NA 5909RG, nas sementes inoculadas no dia da semeadura com utilização de osmoprotetor, apresentaram plantas com maior MSPA inferindo que quanto maior o NNP E MSN, maior a possibilidade de se obter plantas com maior desenvolvimento de parte aérea (Tabela 1). Comportamento que ocorreu, provavelmente, devido ao maior número de bactérias que realizaram simbiose com as raízes da planta e por conseqüência maior foi o fornecimento de nitrogênio para o seu desenvolvimento (SANTOS et al., 2013).

Tabela 3 - Massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹), número de legumes (NLP, planta⁻¹) e massa de mil grãos (MMG, g) para a cultivar NS 6209RR semeada na primeira época e massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA, g planta⁻¹) para a cultivar NA 5909RG semeada na segunda época, em função do pH do solo.

pH	NS 6209RR			NA 5909RG
	MSPA (g)	NLP	MMG	MSPA (g)
5,3	13,6b*	87,4b	150,7 ^a	16,7b
6,5	15,5 ^a	102,0a	144,1b	19,1 ^a

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

Dentre os principais componentes de produtividade para a cultura da soja estão o número de legumes e a massa seca de grãos por planta (DALCHIAVON; CARVALHO, 2012). Na cultivar NA 5909RG, em solo com pH 6,5, na primeira e segunda época de semeadura, o NLP, não diferiu em função dos tratamentos aplicados. Podendo ser explicado por solos com pH mais altos terem sua população de *Bradhiryzobium* já estabelecida, ou seja, a nodulação das raízes das plantas não é somente dependente da inoculação. Em relação a não existência de diferenças significativas entre as sementes inoculadas e não inoculadas. Golo et

al. (2009) também não encontraram diferenças significativas, pois na área do experimento já vinha sendo cultivada a soja, onde eram realizadas inoculações do rizóbio. Situação que se assemelha as condições do presente estudo.

Em pH 5,3, na primeira época, passa essa mesma cultivar, as plantas que apresentaram maior NLP foram as que continham osmoprotetor no tratamento. Na segunda época, maior NLP foram encontrados nas plantas em que as sementes foram somente inoculadas e nas com osmoprotetor, com exceção do tratamento onde as sementes foram inoculadas 14 DAS (Tabela 4). Contudo, quando já se possui populações de rizóbios estabelecidas pode haver competição entre essas e as inoculadas, sendo que, geralmente, as já estabelecidas não possuem mais os genótipos das bactérias que são inoculadas devido a alterações genéticas que ocorrem (MELCHIORRE et al., 2011), acabando por competirem com os rizóbios que foram inoculados e que possuem melhor qualidade (LÓPEZ et al., 2009). Portanto, o NNP pode ter sido inferior, mas as bactérias que realizam a simbiose foram mais eficientes na FBN, permitindo a formação de maior NLP.

Já para a cultivar NS 6209RR, na primeira época de semeadura houve diferença significativa somente para o fator principal pH, indicando um maior NLP nas plantas cultivadas em solo com pH mais elevado (Tabela 3), sendo esse relacionado ao maior desenvolvimento da planta em pH mais altos.

A MMG apresentou interação significativa entre os tratamentos dos diferentes pH e momentos de inoculação somente na cultivar NA 5909RG, tanto na primeira quanto na segunda época de semeadura. Em pH 6,5, na primeira época, quando a inoculação foi realizada no dia da semeadura obteve-se maior MMG e, para segunda época, médias superiores foram obtidas nos tratamentos TSB7 e TSB14 (Tabela 4). Podendo-se observar, principalmente para a primeira época, que os tratamentos que obtiveram MMG superior foram os mesmos que continham maiores MSN. Em trabalho realizado por Pereira et al. (2016), não foi encontrada diferença significativa na MMG, porém, os autores verificaram uma relação entre a MMG e MSN. Para pH 5,3, na primeira época, as inoculações realizadas até os sete dias obtiveram uma maior MMG independente da utilização de osmoprotetor, porém, no tratamento onde se utilizou osmoprotetor, a MMG manteve-se superior até os 11 DAS (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de legumes (NLP, planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para a cultivar NA 5909RG, para primeira e segunda época de semeadura.

Cultivar NA 5909RG						
TRATAMENTOS ¹	NLP		MMG (g)		PG (kg ha ⁻¹)	
	pH		pH		pH	
	5,3	6,5	5,3	6,5	5,3	6,5
Primeira época de semeadura						
TS	61,3bA	69,7aA	149,3bB	155,7bA	3934cB	4662bA
TSB0	58,5bA	77,5aA	155,3aB	162,7aA	4399bA	4515cA
TSB4	60,4bB	77,6aA	160,9aA	156,7bA	4066cB	4340cA
TSB11	55,2bB	75,6aA	151,1bB	158,6bA	4296bA	4205dA
TSBO0	80,6aA	70,2aA	156,1aB	165,4aA	4495aB	4883aA
TSBO4	73,1aA	76,0aA	157,7aA	153,9bA	4561aA	3654eB
TSBO11	80,3aA	53,7aB	154,8aA	156,0bA	4261bA	4011dB
Média	69,1		156,7		4306,5	
CV %	17,3		2,28		3,2	
Segunda época de semeadura						
TS	175,5bB	313,6aA	149,0aA	141,2bB	3664bA	3529bA
TSB0	236,7aA	278,2aA	151,8aA	143,4bB	3646bA	3785aA
TSB7	270,3aA	276,5aA	147,3aA	147,7aA	3481bB	3738aA
TSB14	282,3aA	230,0aA	147,6aA	148,5aA	3546bB	3847aA
TSBO0	271,7aA	232,2aA	144,9aA	142,2bA	3868aA	3826aA
TSBO7	261,5aA	230,7aA	145,8aA	145,1bA	3797aA	3573bA
TSBO14	213,0bA	258,0aA	148,1aA	143,0bB	3629bA	3466bA
Média	252,1		146,1		3655,7	
CV %	17,0		1,8		4,0	

¹Tratamentos: TS: somente tratamento de semente; TS + I (0): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TS + I (4): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 dias antes da semeadura (DAS); TS + I (11): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS; TS + O + I (0): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da semeadura; TS + O + I (4): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 DAS; TS + O + I (11): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS. Para a segunda época as inoculações foram realizadas aos sete e quatorze DAS, alterando-se os tratamentos T3, T4, T6 e T7. *Letras maiúsculas distintas na linha e letras minúsculas distintas na coluna os tratamentos diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Quanto à produtividade, em ambas as cultivares, é possível observar que em pH 6,5 quando não inoculados a produtividade foi superior quando comparada ao mesmo tratamento em pH 5,3, para a primeira época de semeadura. Sendo a diferença de PG de 15,6% para a NA 5909RG e 10,3% para a NS 6209RR. Ainda, na primeira época de semeadura, em ambos os pH, para a cultivar NA 5909RG, a PG foi superior quando as sementes foram inoculadas no dia da semeadura, com a utilização do osmoprotetor (TSBO0). Porém, em pH 5,3, essa produtividade não diferiu do tratamento TSBO4. Sendo esses também os tratamentos que já vinham apresentando superioridade sobre os demais, para as variáveis NNP, MSPA, NLP, MMG. Para a segunda época de semeadura, em pH 5,3, observa-se a mesma tendência que na primeira época. Observa-se também que TSBO4 e TSBO7, tratamentos da primeira e segunda

época respectivamente, permitiram acréscimos de 10,8% e 8,3% de produtividade aos tratamentos realizados nos mesmos dias sem a utilização de osmoprotetor (Tabela 4).

Deve-se ressaltar que na ausência ou presença de baixas quantidades dos microsimbiontes capazes de nodular e fixar o N_2 e havendo toxicidade ocasionada pelo fungicida a ser utilizado, pode haver redução da nodulação das raízes e, conseqüentemente, na eficiência da fixação biológica de nitrogênio, culminando em redução de produtividade de grãos, devido à disponibilidade de N em quantidades insuficientes (COSTA et al., 2013). Em trabalho realizado por Zilli, Campo e Hungria (2010), também foram encontrados resultados que permitiram a inoculação em até cinco dias antes a semeadura sem prejudicar a produtividade da cultura, porém sem a utilização de fungicidas no tratamento de sementes.

Neste sentido, observa-se que o osmoprotetor mostrou-se uma alternativa para realização da inoculação até quatro e sete dias anteriores a semeadura em solos com pH mais ácidos, facilitando a logística de semeadura do produtor, e também para inoculações realizadas no dia de semeadura para pH menos ácido, sem perder em produtividade pela utilização do tratamento químico de sementes. O tratamento de sementes é uma técnica indispensável, por assegurar a proteção das sementes e das plântulas, delas originadas, contra a ação de insetos-pragas e patógenos proporcionando a manutenção da qualidade fisiológica e sanitária da semente e contribuindo para a obtenção do estande inicial desejado (BARROS; BARRIGOSI; COSTA BARROS, 2005). Trabalho realizado por Conceição et al. (2014) com tratamento químico de sementes com fungicida, inseticida, micronutriente e polímero observaram uma maior proteção das sementes e plântulas no campo, porém sem efeito significativo na produtividade.

Em pH 6,5, não se observou diferença significativa entre os tratamentos inoculados e inoculado no dia da semeadura com adição de osmoprotetor, sendo esses os que apresentaram produtividades superiores aos demais (Tabela 4). Possivelmente pela população de *Bradyrhizobium* já presente na área onde foi instalado o experimento, como citado anteriormente.

Para a cultivar NS 6209RR em pH 6,5, na primeira época de semeadura, não se obteve diferença significativa na produtividade quando realizados os tratamentos somente com tratamento de sementes, inoculado no dia e aos 11 DAS e inoculado aos 4 e 11 DAS com a adição de osmoprotetor. Em pH 5,3 a produtividade foi superior com a inoculação no dia da semeadura e aos 4 DAS com utilização de osmoprotetor. Na segunda época também obteve-se diferença significativa entre as produtividades, sendo superiores nos tratamentos onde não

houve inoculação ou esta foi realizada no dia da sementeira e quando a inoculação foi realizada aos 14 DAS com utilização de osmoprotetor (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de legumes (NLP, planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹) em função do momento de inoculação e pH do solo para cultivar NS 6209RR, para primeira época de sementeira.

Cultivar NS 6209RR						
TRATAMENTOS ¹	NLP		MMG (g)		PG (kg ha ⁻¹)	
	pH		pH		pH	
	5,3	6,5	5,3	6,5	5,3	6,5
Primeira época de sementeira						
TS	- ²	-	-	-	4292bB	4787aA
TSB0	-	-	-	-	4720aA	4600aA
TSB4	-	-	-	-	4378bA	4091bA
TSB11	-	-	-	-	4363bA	4489aA
TSBO0	-	-	-	-	4046bA	4077bA
TSBO4	-	-	-	-	4573aA	4377aA
TSBO11	-	-	-	-	4276bA	4515aA
Média					4396,55	
CV %					5,18	
Segunda época de sementeira						
TS	263,2aA	202,2aB	-	-	3506,60 ^a	
TSB0	218,3bA	210,0aA	-	-	3462,30 ^a	
TSBO0	190,2bA	185,0aA	-	-	3372,13b	
TSBO7	256,5aA	204,0aB	-	-	3300,57b	
TSBO14	199,6bA	211,5aA	-	-	3531,34 ^a	
Média	214,06				3434,59	
CV %	12,30				3,83	

¹Tratamentos: TS: somente tratamento de semente; TS + I (0): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da sementeira; TS + I (4): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 dias antes da sementeira (DAS); TS + I (11): TS + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS; TS + O + I (0): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, no dia da sementeira; TS + O + I (4): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 4 DAS; TS + O + I (11): TS + osmoprotetor + inoculação com *Bradyrizobium*, 11 DAS. Para a segunda época as inoculações foram realizadas aos sete e quatorze DAS, alterando-se os tratamentos T3, T4, T6 e T7. ²Não houve interação significativa entre os fatores. *Letras maiúsculas distintas na linha e letras minúsculas distintas na coluna os tratamentos diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Quanto à análise multivariada optou-se trabalhar com primeiro componente principal (CP), pois permitiu explicar mais de 77% da variância contida nas variáveis originais. Ao avaliar os valores dos autovetores associados a cada um desses componentes, a variável de maior peso foi a PG, sendo então a principal variável que explica a variabilidade existente dos dados do experimento. A principal variável que explica essa retenção é a produtividade de

grãos, com 0,99 para a cultivar NA 5909RG na primeira e segunda época de semeadura. Para a cultivar NS 6209RR os valores foram de 0,98 e 0,97 para a primeira e segunda época, respectivamente. A variável de menor contribuição na variabilidade total do experimento foi a MSPA (Tabela 6).

Tabela 6 - Pesos nos dois primeiros componentes principais das variáveis número de nódulos em R2 (NNP), massa seca de nódulos em R2 (MSN), massa seca de parte aérea de planta em R2 (MSPA), número de legumes (NLP), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) em função do momento de inoculação e pH do solo para as cultivares NA 5909RG e NS 6209RR, para primeira e segunda época de semeadura.

	Primeira época de semeadura		Segunda época de semeadura	
	NA 5909RG	NS 6209RR	NA 5909RG	NS 6209RR
NNP	0,3481	0,1803	0,9117	1,2535
MSN	6,3790	8,4665	7,1744	15,6536
MSPA	0,0011	0,0024	0,0037	0,0009
NLP	0,0658	0,2581	4,9285	5,1962
MMG	0,0084	0,0168	0,0231	0,0196
PG	93,1973	91,0755	86,9583	77,8759
Conjunto de autovetores associados				
1ª Componente	93,1973	91,0755	86,9583	77,8759
NNP	0,0124	-0,0569	0,0170	0,0924
MSN	0,0388	-0,1667	0,0711	0,2203
MSPA	0,0006	0,0023	0,0007	-0,0001
NLP	0,0105	-0,0160	-0,0404	-0,0246
MMG	0,0067	0,0010	0,0005	0,0008
PG	0,9991	0,9842	0,9965	0,9707

CONCLUSÃO

As sementes inoculadas aos quatro e sete dias anteriores à semeadura, com utilização de osmoprotetor juntamente com a inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, proporcionaram produtividades 10,8% e 8,3% superiores aos tratamentos realizados nos mesmos dias sem osmoprotetor, para cultivar NA 5909RG, em solo com pH 5,3.

A utilização do osmoprotetor juntamente com a inoculação de *Bradyrhizobium* é uma alternativa para utilização em solos com pH baixo, pois proporciona maior número e massa seca de nódulos e conseqüentemente maior produtividade de grãos.

A produtividade de grãos, para as cultivares NA 5909RG e NS 6209RR, foi 15,6 % e 10,3% superior, respectivamente, no solo com menor condição de acidez, comparado ao de maior acidez, quando ambos não receberam inoculação das sementes.

A análise de componentes principais mostrou-se eficiente destacando a importância da manutenção da variável produtividade de grãos, assim como a eliminação da variável massa seca de parte aérea, para explicação da variabilidade total existente nos dados do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMARAZ, J. J. et al. Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1391-1393, 2007.

ALVA, A. K. et al. Nodulation and early growth of soybean mutants with increased nodulation capacity under acid soil infertility factors. **Agronomy Journal**, v. 80, p. 836-841, 1988.

ANNAPURNA, K. *Bradyrhizobium japonicum*: survival and nodulation of soybean as influenced by fungicide treatment. **Indian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 305-307, 2005.

BAYS, R. et al. Recobrimento de sementes de soja com micronutrientes, fungicida e polímero. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 60-67, 2007.

BARROS, R. G.; BARRIGOSI, J. A. F.; COSTA, J. L. S. Efeito do armazenamento na compatibilidade de fungicidas e inseticidas, associados ou não a um polímero no tratamento de sementes de feijão. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 459-465, 2005.

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

CAMPO, R. J. et al. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1103-1112, 2010.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009.

CAMPO, R. J. et al. Efeito da população de células na nodulação e rendimento da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30., 2008, Rio Verde. **Resumos...** Londrina: Embrapa soja, 2008. p. 302-304 (Embrapa Soja. Documentos, 343).

CHUEIRI, W. A.; PAJARA, F.; BOZZA, D. **Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja**. Manah: Divulgação técnica, n. 169. 2005. Disponível em: <http://www.manah.com.br/downloadpdf.aspx?pdf=/media/4691/dt_manah_169.pdf>. Acesso em: 14 out. 2016.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 11. ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul. v.1, 2016. 376p.

CONCEIÇÃO, G. M. et al. Desempenho de plântulas e produtividade de soja submetida a diferentes tratamentos químicos nas sementes. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1711-1720, 2014.

COSTA, M. R. et al. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura.. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.3, p.186-192, 2013.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013

DEAKER, R.; HARTLEY, E.; GEMELL, G. Conditions affecting shelf-life of inoculated legume seed. **Agriculture**, v.2, p. 38-51, 2012.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, p. 573–580, 2007.

DEKA, A. K.; AZAD, P.; PATRA, S. C. Survival of *Rhizobium* in soil at different pH, temperature and moisture levels. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 12, p. 751-754, 2006.

DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host development pathways. **Cell Host Microbe**, v. 10, p. 348-358, 2011.

DUZAN, H. M. et al. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2641-2646, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Indicações Técnicas para a Cultura da Soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2014/2015 e 2015/2016**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014. 124 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 382).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, 2013. 353p.

ESPAÑA, M.; CABRERA-BISBAL, E.; LÓPEZ, M. Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using ¹⁵N. **Interciência**, v. 31, p. 197-201, 2006.

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.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. **Microrganismos e Agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura. 1. ed. Guaíba: Agro Livros, 2008. 568p.

FIPKE, G. M. **Co-inoculação e pré-inoculação de sementes em soja**. 2015. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

HARTLEY, E. J; GEMELL, L. G; DEAKER, R. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed. **Crop & Pasture Science**, v. 63, p. 858–865, 2012.

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

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.; 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. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M. et al. 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. (Eds.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, 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 Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

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

JORDAN, D. C. Family III *Rhizobiaceae* CONN 1938, 321AL. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.1, p. 235-244, 1984.

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.

MARKS, B. B. et al. Evaluation of survival *Bradyrhizobium spp* in soybean seed treated with fungicides, guard and cellular inoculant. **Revista Internacional de Ciências**, v. 3, n. 1, p. 43-51, 2013.

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

MENTEN, J. O.; HELOISA, M.; MORAES, D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Abrates**, v. 20, n. 3, p. 52-71, 2010.

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

ONUH, M. O.; DONALD, K. M. Effects of water stress on the rooting, nodulation potentials and growth of cowpea (*Vigna unguiculata (L) Walp*). **Science World Journal**, v. 4, p. 31-34, 2009.

PEELL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Science**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PENNA, C. et al. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, v. 1, p. 1-21, 2011.

PEREIRA, C. S. et al. Diferentes vias, formas e doses de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* na cultura da soja. **Global Science and Technology**, v. 9, p. 56–67, 2016.

PEREIRA, C. E. et al. Compatibility among fungicide treatments on soybean seeds through film coating and inoculation with *Bradyrhizobium* strains. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 585-589, 2010.

PEREIRA, C. E. et al. Tratamento fungicida via peliculização e inoculação de *Bradyrhizobium* em sementes de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 433-440, 2009.

PIRES, J. L. L.; BRAGANTINI, C.; COSTA, J. L. D. Storage of dry bean seeds coated with polymers and treated with fungicides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 709-715, 2004.

QUAGGIO, J. A. et al. Respostas da soja à aplicação de calcário e gesso e lixiviação de íons no perfil do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 375-383, 1993.

RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 81-88, 2011.

RUFINI, M. **Eficiência da simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro comum em diferentes condições de pH**. 2010. 91p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2010.

SANTOS, M. A. et al. Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in soybean. **Hereditas**, v. 150, p.17–25, 2013.

SANTOS, P. F. et al. Efeito do tratamento de sementes na nodulação e crescimento inicial da cultura da soja. **Cultivando o saber**, v. 6, n. 4, p. 96-108, 2013.

SILVA, A. F. et al. Inoculation with *Bradyrhizobium* and application forms of cobalt and molybdenum in soybean crop. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 98-104, 2011.

SILVA, I. R.; MENDONÇA, E. S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 275-374.

SINCLAIR, T. R.; PURCELL, L. C.; KING, C. A. Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation. **Field Crops Research**, v. 101, p. 68-71, 2007.

SOUZA, R. A. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.83-91, 2008.

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

SUGAWARA, M. et al. Rhizobitoxine modulates plant–microbe interactions by ethylene inhibition. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 382-388, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A. Efeito do gesso agrícola e do calcário aplicados em solo ácido na composição química das folhas, teores e produtividade de proteína e óleo da soja. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBCS, 1992. p. 354-355.

VRIEZEN, J.; DE BRUIJN, F.; NÜSSLEIN, K. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth-phase, temperature, chloride and sulfate availability. **Letters Applied Microbiology**, v. 42, p.172–178, 2006.

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.

ZILLI, J. E. et al. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 917-923, 2009.

ZILLI, J. E. et al. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 541-544, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, alguns benefícios em relação a utilização de osmoprotetor juntamente com o tratamentos de sementes e inoculação da soja foram observados. Inoculações até quatro e sete dias antes da semeadura em solos com pH mais ácidos foram eficientes, sendo essa a condição da grande maioria dos solos do Rio Grande do Sul. Portanto, o osmoprotetor viabilizou a inoculação em dias anteriores a semeadura, o que otimiza o tempo destinado para essa operação, sem desperdício de tempo e mão de obra no dia da semeadura. Garantindo também um melhor recobrimento das sementes com o inoculante, que por vezes não é atendido quando as sementes são inoculadas no mesmo dia da semeadura.

Ressalta-se também a importância de se ter um ambiente adequado, em relação ao pH do solo para condição de sobrevivência das bactérias, sendo essa indicada pela maior número e massa da matéria seca de nódulos, culminando em maior desenvolvimento das plantas. Sendo o solo com menor condição de acidez o responsável por maior sobrevivência das bactérias e conseqüentemente maior produtividade, quando esses não receberam inoculação das sementes.

É importante também ressaltar que o número de cultivares de soja disponíveis é alto e essas possuem características distintas. Além disso, há sempre novas tecnologias de manejos de inoculação sendo lançados. Por tanto, enfatiza-se a necessidade de constantes estudos com intuito de alcançar maiores patamares de produtividade, visando a sustentabilidade do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVA, A. K. et al. Nodulation and early growth of soybean mutants with increased nodulation capacity under acid soil infertility factors. **Agronomy Journal**, v. 80, p. 836-841, 1988.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 76, p. 319-330, 2006.
- BAUDET, L.; PESKE, S. T. A logística do tratamento de sementes. **Seed News**, v. 10, p. 20-23, 2006.
- BIKROL, A. et al. Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicides seed treatment. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.667-671, 2005.
- CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, v. 147, p. 1- 9, 2014.
- CÂMARA, G. M. S. Nitrogênio e produtividade da soja. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: Tecnologia da produção II**. Piracicaba, 2000, p. 295-339.
- CAMPO, R. J. et al. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1103-1112, 2010.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009.
- CAMPO, R. J. et al. Efeito da população de células na nodulação e rendimento da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30., 2008, Rio Verde. **Resumos...** Londrina: Embrapa soja, 2008. p. 302-304 (Embrapa Soja. Documentos, 343).
- COMITÊ ESTRATÉGICO SOJA BRASIL. Desafio nacional de máxima produtividade: case do campeão nacional 14/15. 2015. Disponível em: <<http://www.cesbrasil.org.br/wp-content/uploads/2016/07/Caso-do-Campea%CC%83o-Nacional-Safra-1415.pdf>>. Acesso em: 29 de mar. 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, V.3 - SAFRA 2015/16, N.9 - Nono Levantamento, Junho/2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_09_00_00_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf>. Acesso em: 10 de set. 2016.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. Desempenho de plântulas e produtividade de soja submetida a diferentes tratamentos químicos nas sementes. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1711-1720, 2014.

- COSTA, M. R. et al. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura.. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.3, p.186-192, 2013.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, p. 573–580, 2007.
- DEKA, A. K.; AZAD, P.; PATRA, S. C. Survival of *Rhizobium* in soil at different pH, temperature and moisture levels. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 12, p. 751-754, 2006.
- DENARDIN, N. D. A. Fixação biológica de nitrogênio em interação com produtos fitossanitários, químicos e biológicos, por leguminosas. **Informativo Abrates**, v. 20, p. 63, 2010.
- DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host development pathways. **Cell Host Microbe**, v. 10, p. 348-358, 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Indicações Técnicas para a Cultura da Soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2014/2015 e 2015/2016**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014. 124 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 382).
- EMBRAPA SOJA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção da soja: Região Central do Brasil 2011 e 2012**. Londrina, 2011. (Embrapa Soja, Sistemas de Produção, 13).
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Massachussets: Sinauer, 2005. 380p.
- ESPAÑA, M.; CABRERA-BISBAL, E.; LÓPEZ, M. Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using 15N. **Interciência**, v. 31, p. 197-201, 2006.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Special Report, 80).
- FIGUEIREDO, M. V. B. et al. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. 1. ed. Guaíba: Agro Livros, 2008. 568p.
- FIPKE, G. M. **Co-inoculação e pré-inoculação de sementes em soja**. 2015. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen-fixation in perspective: na overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

HARTLEY, E. J.; GEMELL, L. G.; DEAKER, R. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed. **Crop & Pasture Science**, v. 63, p. 858–865, 2012.

HENNING, A. A.; CAMPO, R. J.; SFREDO, G. J. **Tratamento com fungicidas, aplicação de micronutrientes e inoculação de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1997. 7p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 58).

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.; 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. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M. et al. 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. (Eds.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, 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 Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed). **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1997, p.187-294.

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

JORDAN, D. C. Family III *Rhizobiaceae* CONN 1938, 321AL. In: KRIEG, N. R. H., J. G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, p. 235-244, 1984.

KOLLER, H. R.; NYQUIST, W. F.; CHORUSH, I. S. Growth analysis of the soybean community. **Crop Science**, v. 10, p. 407-412, 1986.

MARKS, B. B. et al. Evaluation of survival *Bradyrhizobium spp* in soybean seed treated with fungicides, guard and cellular inoculant. **Revista Internacional de Ciências**, v. 3, n. 1, p. 43-51, 2013.

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja e uso de micronutrientes. **Revista Campo & Negócios**. Uberlândia-MG, 15 nov. 2014. Disponível em: <
<http://www.revistacampoenegocios.com.br/inoculacao-da-soja-e-uso-de-micronutrientes/>>. Acesso em: 23 out. 2016.

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

QUAGGIO, J. A. et al. Respostas da soja à aplicação de calcário e gesso e lixiviação de íons no perfil do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 375-383, 1993.

PENNA, C. et al. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, v. 1, p. 1-21, 2011.

PEREIRA, C. E. et al. Compatibility among fungicide treatments on soybean seeds through film coating and inoculation with *Bradyrhizobium* strains. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 585-589, 2010.

PIRES, J. L. L.; BRAGANTINI, C.; COSTA, J. L. D. Storage of dry bean seeds coated with polymers and treated with fungicides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 709-715, 2004.

RAMPIM, L. et al. Inoculation of *Bradyrhizobium* with cellular additives and micronutrients in soybean seeds cultivated in Oxisol under no-tillage system. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 24, p. 1613-1621, 2015.

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

REIS JÚNIOR, F. B. et al. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. (Eds.). **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247-281. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca>>. Acesso em: 15 out. 2016.

RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 81-88, 2011.

SANTA, O. R. D. et al. Influência da inoculação de *Azospirillum* sp. em trigo, cevada e aveia. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 4, p. 197-207, 2008.

SCOTT, J. M. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 43-83, 1989.

SILVA, A. F. et al. Inoculation with *Bradyrhizobium* and application forms of cobalt and molybdenum in soybean crop. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 98-104, 2011.

SILVA, I. R.; MENDONÇA, E. S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 275-374.

SOUZA, L. H. et al. Effect of pH of rhizospheric and non-rhizospheric soil on boron, copper, iron, manganese, and zinc uptake by soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1641-1652, 2010.

STREETER J. G. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 1282–1290, 2007.

SUGAWARA, M. et al. Rhizobitoxine modulates plant–microbe interactions by ethylene inhibition. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 382-388, 2006.

TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A. Efeito do gesso agrícola e do calcário aplicados em solo ácido na composição química das folhas, teores e produtividade de proteína e óleo da soja. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBCS, 1992. p. 354-355.

WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. II. Field studies. **Agronomy Journal**, v. 66, p. 233-236, 1974.

VIEIRA NETO, S. A. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 861-870, 2008.

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.

ZILLI, J. E. et al. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 917-923, 2009.

APÊNDICE

Resumo da análise de variância, representado pelos quadrados médios.

ÉPOCA 1		NA 5909RG					
FV	GL	NNP¹	MSN	MSPA	NLP	MMG	PG
Tratamento (D)	6	2799,18*	19851,74*	12,15*	201,57	66,67*	335146,50*
pH (C)	1	470,07	2951,19	0,05	85,28	161,80*	18960,83
Bloco	3	1040,96*	2639,35	0,14	224,78	34,38	72065,22*
DXC	6	1095,16*	24841,57*	9,17*	495,93	64,33*	551666,13*
CV %		14,7	7,26	12,06	17,33	2,28	3,2
Média		119,13	547,49	12,36	69,12	156,77	4306,55
ÉPOCA 2		NA 5909RG					
FV	GL	NNP	MSN	MSPA	NLP	MMG	PG
Tratamento (D)	6	679	6290,05*	0,83	1157,05	22,03*	66391,97*
pH (C)	1	4960,95*	10097,75*	79,51*	3348,17	155,94*	13830,77
Bloco	3	2589,59*	7351,59*	7,67	2238,57	24,27*	15951,29
DXC	6	750,61	5763,65*	5,61	8815,32*	29,24*	77092,68*
CV %		22,72	20,84	11,94	17,03	1,82	4,03
Média		104,88	183,26	17,93	252,18	146,16	3655,74
ÉPOCA 2		NS 6209RR					
FV	GL	NNP	MSN	MSPA	NLP	MMG	PG
Tratamento (D)	4	1712,1	13994,38*	4,24	2764,18*	13,75	74352,04*
pH (C)	1	1286,29	5079,38	2	5305,42*	11,62	12442,55
Bloco	3	1291,65	3696,34	1,84	387,46	10,57	9048,48
DXC	4	1992,53	7278,22*	13,74*	2030,08*	19,72	16975,54
CV %		27,69	22,22	12,39	12,3	2,32	3,83
Média		107,44	194,15	17,98	214,06	126,55	3434,59

*significativo pelo teste F a 5% de probabilidade de erro, respectivamente. Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Coeficiente de variação (CV%). ¹variável explicativa: número de nódulos (NNP, planta⁻¹), massa seca de nódulo (MSN, mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea (MSPA, g planta⁻¹), número de legumes (NLP, planta⁻¹), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹).