

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Eficiência do uso de fertilizantes, fungicidas e inoculante no tratamento de sementes de soja**

**Loduvino Consalter Beltrame**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba  
2009**

Loduvino Consalter Beltrame  
Zootecnista

**Eficiência do uso de fertilizantes, fungicidas e inoculante no tratamento de sementes de soja**

Orientador:  
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Beltrame, Loduvino Consalter

Eficiência do uso de fertilizantes, fungicidas e inoculante no tratamento de sementes de soja / Loduvino Consalter Beltrame. - - Piracicaba, 2009.  
62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Cobalto 2. Fertilizantes 3. Molibdênio 4. Soja I. Título

CDD 633.34  
B453e

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Aos meus pais (*in memoriam*), Ângelo e Luiza, pela educação que me foi dada, e firmeza de caráter;

À minha esposa Eneida, pelo estímulo, dedicação e desprendimento;

Aos meus filhos, Giovani, Alessandra e Cristiano, pela seriedade e escolhas perante a vida;

Ao meu genro Emilson, pela grandeza e camaradagem; e

Aos meus irmãos, Valdomiro (*in memoriam*), Olímpia, Noelir, Jacira, Algacir, Mirtes e Beloni, pelas alegrias que proporcionam.

**Dedico**



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

- (i) inicialmente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, que por intermédio do programa de Pós-graduação em Fitotecnia e do apoio da Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS), proporcionou um excelente curso em nível de Mestrado;
- (ii) a todos os docentes que fizeram parte do Curso. Em destaque, os Professores Paulo Augusto Manfron e Durval Dourado Neto, meu orientador, pelo ensino competente e desprendido;
- (iii) aos colegas e amigos, pelo apoio solícito de todo momento;
- (iv) aos alunos Darlan, Renato e Wilens do Curso de Tecnologia em Agronegócio pela colaboração na execução na coleta de dados; e
- (v) ao Engenheiro Agrônomo (Mestre) Danie Sanchotene e ao Dr. Sylvio Henrique Bidel Dornelles (Professor do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria), pela cessão dos dados.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Importância econômica da cultura de soja.....	21
2.2 Produtividade da cultura de soja.....	22
2.3 Uso de inoculantes e eficiência na fixação biológica de nitrogênio na cultura de soja .....	23
2.4 Eficiência do uso combinado de fertilizantes e inoculantes via tratamento de sementes ...	24
2.5 Especificidade da infecção <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na planta de soja.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Experimento I: estudo do efeito da aplicação isolada ou em mistura de macronutrientes e micronutrientes com fungicidas no desenvolvimento de <i>Bradyrhizobium</i> em meio de cultura YMA .....	31
3.1.1 Local e época de realização dos experimentos .....	31
3.1.2 Descrição dos tratamentos.....	31
3.1.3 Avaliação do efeito do tratamento de sementes.....	32
3.1.4 Primeira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de <i>Bradyrhizobium</i> .....	32
3.1.5 Segunda etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de <i>Bradyrhizobium</i> .....	34
3.1.6 Terceira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de <i>Bradyrhizobium</i> .....	35
3.1.7 Procedimento de cálculo do número de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	36
3.2 Experimento II: estudo do efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de bactérias do grupo <i>Rhizobium</i> em condições de campo ...	37
3.3 Local e época de realização do experimento .....	37



3.3.1	Análise química e granulométrica da amostra representativa do solo.....	37
3.3.2	Variedade e tratos culturais .....	38
3.3.3	Descrição dos tratamentos .....	38
3.3.4	Delineamento experimental.....	39
3.3.5	Avaliações efetuadas .....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Experimento I: estudo do efeito da aplicação isolada ou em mistura de micronutrientes com fungicidas no desenvolvimento de <i>Bradyrhizobium</i> spp. em meio de cultura YMA..	41
4.2	Experimento II: estudo do efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de bactérias do grupo <i>Rhizobium</i> spp. em condições de campo .....	44
4.3	Considerações finais.....	53
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

## RESUMO

### **Eficiência do uso de fertilizantes, fungicidas e inoculante no tratamento de sementes de soja**

Com objetivo de avaliar a eficiência do uso de fertilizante (contendo macronutrientes - nitrogênio, fósforo e potássio - e micronutrientes - cobalto e molibdênio), associado a fungicida e a inoculante, no tratamento de sementes de soja (variedade cultivada FT-Abyara), foram realizados dois experimentos, em laboratório (2007) e em campo (safra agrícola de 2007/2008), no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria-RS. O experimento I constou de tratamentos de doses de macronutrientes e micronutrientes em mistura com os fungicidas Thiram e Carbendazim aplicados em *Bradyrhizobium* spp. em meio de cultura YMA. O experimento II foi realizado para avaliar o efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp. e sua influência no crescimento da planta. Com relação aos diferentes fertilizantes avaliados, verifica-se que o maior número de nódulos por planta e maior massa de matéria seca de nódulos foi obtido com os compostos que continham cobalto e molibdênio, resultado também observado em relação aos tratamentos com fungicidas. Os resultados experimentais permitem inferir que todos os tratamentos com fertilizantes aplicados via sementes aumentaram significativamente a altura de planta, o comprimento de raiz, e a massa de matéria seca da parte aérea e de raiz quando comparados à testemunha sem tratamento com fertilizante, fungicida e inoculante. Em função dos resultados obtidos neste trabalho com a cultura de soja, pode-se concluir que: (i) o tratamento de sementes com fungicidas diminui o número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp.; (ii) a utilização de cobalto e molibdênio no tratamento de sementes proporciona aumento na quantidade de células de *Bradyrhizobium* spp.; e (iii) o melhor parâmetro para avaliar a eficiência da inoculação no tratamento de sementes é o número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*; *Glycine max*; Macronutrientes; Cobalto; Molibdênio



## ABSTRACT

### Efficiency of fertilizers, fungicides and inoculant utilization in the soybean seed treatment

With the purpose of evaluating the efficiency of fertilizers (with macronutrients - nitrogen, phosphorus and potassium - and micronutrients - cobalt e molybdenum), fungicides and inoculant utilization in the soybean (cultivar 'FT-Abyara') seed treatment, two experiments were carried out, in laboratory (2007) and in field (season 2007/2008), at Biology Department of Federal University of Santa Maria, in Santa Maria, 'Rio Grande do Sul' State, Brazil. The experiment I consisted of evaluating the macronutrients and micronutrients doses treatments mixed with fungicides (Thiram and Carbendazim) applied in the YMA culture medium of *Bradyrhizobium* spp. The experiment II consisted of evaluating the soybean seed treatment (with micronutrients and fungicides) effect on *Bradyrhizobium* spp. survival and its influence on the plant growth. In relation to different evaluated fertilizers, the higher number of nodules per plant and higher nodules dry mass were obtained with cobalt and molybdenum seed treatments. Similar results also were obtained with fungicides treatments. According to the results, all treatments with fertilizers increased the soybean plant height, root length, dry matter of canopy and roots when compared to the control (without fertilizers, fungicides and inoculant). According to the results, there are the following conclusions: (i) the seed treatment with fungicides decreases the viable cells number of *Bradyrhizobium* spp.; (ii) the utilization of cobalt and molybdenum in the seed treatment increases the *Bradyrhizobium* spp. cells number; and (iii) the best parameter to evaluate the seed treatment inoculation efficiency is the viable cells number of *Bradyrhizobium* spp.

Keywords: *Bradyrhizobium*; *Glycine max*; Macronutrients; Cobalt; Molybdenum



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Primeira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.: (A) hidratação das sementes: (i) adição de 0,4 mL de água; e (ii) agitação manual por 1 minuto; (B) tratamentos: (i) adição da dose correspondente do tratamento; e (ii) agitação manual por 1 minuto; e (C) inoculação: (i) adição de 0,24 mL de inoculante; e (ii) agitação manual por 1 minuto. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002) .....34
- Figura 2 - Incubação (segunda etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.): (i) adição de 200 mL de água destilada e estéril; (ii) agitação manual por 1 minuto; e (iii) incubação em temperatura ambiente por uma hora e meia. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002).....35
- Figura 3 - Terceira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.: diluições para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002).....35



### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos e doses (mL do produto comercial por 100 kg de sementes) em sementes de soja variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007 .....	32
Tabela 2 - Doses dos fungicidas (F, mL por 80 g de sementes) e inoculante (I, mL por 80 g de sementes) aplicadas no tratamento de semente de soja variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007 .....	33
Tabela 3 - Análise química e granulométrica da amostra representativa do solo no local do experimento. Laboratório do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 1 de outubro de 2007 .....	38
Tabela 4 - Descrição dos tratamentos e doses (mL do produto comercial por 100 kg de sementes). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008 .....	39
Tabela 5 - Efeito dos tratamentos sobre o número de células de <i>Bradyrhizobium</i> spp. por mL de inoculante ( $n_0$ ). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007 .....	42
Tabela 6 - Efeito dos tratamentos sobre o número de células de <i>Bradyrhizobium</i> spp. por semente de soja ( $n_1$ ). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007 .....	43
Tabela 7 - Efeito relativo (ER, %) do tratamento sobre o número de <i>Bradyrhizobium</i> spp. por semente de soja em relação à testemunha. Santa Maria, RS. 2007 .....	43
Tabela 8 - Efeito de diversos tratamentos de semente sobre o número de nódulos de <i>Bradyrhizobium</i> spp. por planta (NNB) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008 .....	45
Tabela 9 - Efeito do tratamento de semente sobre o comprimento de raízes (Cs, cm) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008 .....	47
Tabela 10 - Efeito do tratamento de semente sobre a massa seca de raiz ( $MSr, g.planta^{-1}$ ) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura	



(DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008.....	48
Tabela 11 - Efeito do tratamento de semente sobre o altura (H, cm) da parte aérea de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008 .....	50
Tabela 12 - Efeito do tratamento de semente sobre a massa de matéria seca da parte aérea (MSpa, g.planta <sup>-1</sup> ) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008.....	51
Tabela 13 - Efeito do tratamento de semente sobre a produtividade de grãos (P, kg.ha <sup>-1</sup> ) de soja, variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil produziu na safra agrícola 2003/2004, 49.172.400 toneladas de soja em uma área de 21.243.700 hectares e a produtividade média das lavouras de soja vêm aumentando significativamente ao longo dos anos, atingindo na safra 2003/2004 a produtividade média de 2340 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2006).

Por ser uma cultura de várias utilidades, em 2003, havia uma demanda mundial de consumo cerca de 184 milhões de toneladas, sendo que o Brasil é o segundo maior produtor mundial (AGRIANUAL, 2004).

A cultura de soja (*Glycine max* L. Merrill) atingirá na safra 2009/2010, em nível mundial, uma área de 99 milhões de hectares, com uma produção de 242 milhões de toneladas, sendo que no Brasil a área de cultivo chegará a 22 milhões e a produção próxima a 60 milhões de toneladas (PROVANCE, 2009).

Seu preço é determinado pela negociação do grão nas principais bolsas de mercadoria (US\$265,00 a US\$305,00 por tonelada, em 2009) (USDA, 2009).

Os Estados Unidos atualmente utilizam 29 milhões de toneladas anualmente e deverá aumentar para 33 milhões de toneladas nas próximas duas décadas. O Brasil utiliza menos de 8 milhões de toneladas, mas aumentará para mais de 11 milhões de toneladas em 2030. A China utiliza 18,7 milhões de toneladas, e deverá atingir cerca de 88 milhões de toneladas em 2030 (PROVANCE, 2009; ELLIS, 2009).

O aumento na produtividade acarreta maior eficiência em todos os processos produtivos de soja. Avanços no melhoramento genético da planta e nas pesquisas em microbiologia do solo tornarem possível substituir a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (LIMA; LOPES; LEMOS, 1998 e MOREIRA, 1991), proporcionado um suprimento de quase todo nitrogênio demandado pela cultura, equivalente a mais de 250 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio por cultivo (URQUIAGA; BODDEY; NEVES, 1999), representando uma economia equivalente a 1,4 bilhões de dólares.

A inoculação de bactérias do gênero *Bradyrhizonium* em sementes de soja proporciona considerável redução nos custos de produção, devido à diminuição ou até mesmo a eliminação da necessidade de adubação nitrogenada, evitando, impactos ambientais devido aos processos de lixiviação desses compostos nitrogenados, poluindo os mananciais hídricos e/ou podendo afetar a

camada de ozônio através da desnitrificação (DEPOLLI; FRANCO, 2000; CAMPO; HUNGRIA, 2000; EMBRAPA, 2001).

Nos últimos anos, tem aumentado a disponibilidade de produtos comerciais contendo micronutrientes, mas resultados experimentais têm demonstrado grande variabilidade, tornando esta prática contraditória (BRONDANI et al., 2003).

Por outro lado, o aumento na produtividade da soja com conseqüente diminuição do custo relativo no uso de micronutrientes e a expectativa de ganhos em escala, tem motivado produtores a utilizar formulações com micronutrientes, principalmente aqueles à base de cobalto e molibdênio, por sua reconhecida influência na fixação simbiótica de nitrogênio na soja (HENNING, 1996; HENNING et al., 2003).

Respostas a micronutrientes tem sido mais freqüentes nas condições de cerrado, onde Broch e Fernandes (1999) mostraram que na média de 12 estudos com micronutrientes aplicados via semente de soja, todos os tratamentos obtiveram aumento de produtividade em relação à testemunha, chegando a atingir aumento de 6,5 sacas por hectare.

No entanto, no sul do Brasil, a resposta à aplicação de micronutrientes depende muito da combinação de uma série de fatores, ainda não bem estudados. Entre esses fatores, tem relevância o tipo de solo onde está sendo cultivada a soja e o sistema de cultivo do solo empregado (DORNELLES et al., 2006). Por isso, há a necessidade de implementação de novas pesquisas que auxiliem técnicos e produtores na sua tomada de decisão sobre o uso de micronutrientes, embora se deva considerar que este tema sempre será objeto de discussão para cada situação, evitando-se generalização.

No mercado brasileiro existe uma gama de micronutrientes, fungicidas e estimulantes utilizados conjuntamente com a inoculação de *Bradyrhizobium* spp. nas sementes de soja (PEREIRA, 2005). No entanto, as empresas do setor continuam a investir no desenvolvimento de novos produtos ou de conhecê-los melhor para que possam suprir as necessidades dos agricultores. Neste contexto, os órgãos oficiais de pesquisa podem contribuir para o desenvolvimento da agricultura brasileira.

Cobalto e molibdênio são micronutrientes necessários à ocorrência da fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja pela ação de bactérias (*Bradyrhizobium* spp.). A adubação é usualmente feita pela deposição do produto sobre a semente. De forma similar, fungicidas são utilizados como protetores da semente e sua aplicação é feita usualmente na forma líquida,

recobrando a semente. Há relatos na literatura da redução da viabilidade das células de *Bradyrhizobium* spp. inoculadas em sementes de soja quando outros produtos são aplicados concomitantemente.

Além do cobalto (Co) e do molibdênio (Mo), a disponibilidade de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) influenciam no processo de nodulação em plantas de soja. O fósforo atua na transferência de energia na forma de ATP para o nódulo além de proporcionar acréscimos no número de pêlos radiculares, promovendo mais sítios de infecção para a bactéria (OTHMAN et al., 1991; OKELEYE; OKELANA, 1997), sendo que, em sua deficiência ocorre comprometimento da fixação biológica (FREIRE FILHO et al., 2005).

O potássio, por afetar diretamente a fotossíntese e translocação de açúcares no floema, é considerado um nutriente relevante no processo da fixação biológica, pois em sua deficiência o fornecimento de açúcares para a bactéria diminui, limitando a nodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio (DUKE; COLLINS, 1985).

Em relação ao nitrogênio, são constatados efeitos adversos à nodulação quando é realizada a adubação nitrogenada em fabáceas. De acordo com Deninson e Harter (1995), a adição de adubos nitrogenados em fabáceas diminui a disponibilidade de oxigênio na respiração nodular.

Para Stefens e Neyra (1983), limitação de carboidratos ao metabolismo do nódulo também é um fator determinante no decréscimo da fixação (STEFENS; NEYRA, 1983).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a eficiência do uso de fertilizantes (contendo macronutrientes e micronutrientes), associados a fungicidas e a inoculantes, no tratamento de sementes de soja.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Importância econômica da cultura de soja**

Essa cultura tem como centro de origem a região leste da China, onde sofreu domesticação por volta do século XI a.C (CALDWELL, 1973).

No Brasil, o primeiro registro da introdução da soja data de 1882, na Bahia, por Gustavo Dutra. Outros registros históricos indicam que a soja "amarela" foi inicialmente semeada na Estação Agrônômica de Campinas, em 1891, para teste como planta forrageira. A partir da década de 70, a cultura de soja evoluiu significativamente nos estados produtores, não só no Sul, mas também nos estados do Centro-Oeste do Brasil. Com o desenvolvimento de novas variedades cultivadas adaptadas às diferentes regiões agroclimáticas do País, o Brasil se tornou o segundo maior produtor mundial de soja (BONATO; BONATO, 1987).

A soja é uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal do mundo. Ela tem sido cultivada comercialmente e utilizada nas alimentações humana e animal por milênios, sem nenhum registro de danos causados aos consumidores ou ao meio ambiente (DALL'AGNOL, 2000).

A soja é amplamente cultivada em vários países do mundo. Os principais produtores mundiais são os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina e a China (EMBRAPA, 2008).

No Brasil, as principais áreas produtoras de soja estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do País, sendo o Paraná, o Rio Grande do Sul, o Mato Grosso e Goiás os principais estados (EMBRAPA, 2008). A revolução sócio-econômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil pode ser comparada ao fenômeno ocorrido com a cana-de-açúcar no Brasil Colônia e do café no Brasil Império.

A soja liderou a implantação de uma nova civilização no Brasil central, levando o progresso e o desenvolvimento para a região despovoada e desvalorizada, fazendo surgir cidades no Cerrado. O explosivo crescimento da produção de soja no Brasil, de quase 30 vezes no transcorrer de apenas três décadas, determinou uma cadeia de mudanças sem precedentes na história do País. A cultura também apoiou ou foi a responsável pela aceleração da mecanização das lavouras brasileiras, pela modernização do sistema de transportes, pela expansão da fronteira agrícola, pela profissionalização e incremento do comércio internacional, pela modificação e enriquecimento da dieta alimentar dos brasileiros, pela aceleração da urbanização do país, pela interiorização da população brasileira (excessivamente concentrada no sul, sudeste e litoral), pela

tecnificação de outras culturas (destacadamente a do milho), assim como, impulsionou e interiorizou a agroindústria nacional (ALMEIDA et al., 2003).

A soja no Brasil é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e proteína. A proteína processada (torta ou farelo) é utilizada como suplemento protéico na ração animal. Esse farelo é torrado/aquecido ao ponto de inativar os fatores antinutricionais naturalmente presentes na soja (FRANÇA NETO; HENNING, 1992; FRANÇA NETO et al., 1998).

O germoplasma de soja possui grande diversidade quanto ao ciclo (número de dias da emergência à maturação), variando de 70 dias, para as mais precoces, a 200 dias, para as mais tardias. De modo geral, as variedades brasileiras têm ciclo entre 100 e 160 dias e, para determinada região, podem ser classificadas em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio (EMBRAPA, 2001).

O ciclo total da planta pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa é o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores, e a fase reprodutiva compreende o período do início do florescimento até o ponto de maturidade fisiológica. A estatura da planta é altamente dependente das condições ambientais e do genótipo. No Brasil, variedades comerciais normalmente apresentam altura média de 60 a 120 cm. O número de flores produzidas é maior do que o que a planta pode converter efetivamente em vagens (RIBEIRO JÚNIOR; FRANCO; LOPES, 1987).

## **2.2 Produtividade da cultura de soja**

No Brasil, a produtividade média da cultura da soja gira em torno de 2.100 kg.ha<sup>-1</sup>, valor muito aquém do desejado de produtividade acima de 3.500 kg.ha<sup>-1</sup> (DORNELLES et al., 2006).

Práticas corretas de manejo podem ser determinantes para a condução adequada da lavoura. Entre elas destacam-se os elementos bióticos (pragas, doenças e plantas daninhas), do clima, da planta, do solo e a interação entre esses fatores que podem auxiliar tanto o produtor quanto o pesquisador no desenvolvimento da cultura (DOURADO NETO et al., 1998).

Na cultura de soja, além do aumento da densidade de semeadura, incrementos de produtividade são dependentes da nutrição das plantas e à eficiente infecção radicular por bactérias fixadoras de nitrogênio, sobretudo ao grupo rizóbio (MOREIRA, 1991).

A importância econômica da inoculação das sementes de soja no país é evidenciada pela economia quanto ao uso de fertilizantes nitrogenados. A adubação com uréia, por exemplo,

resultaria em um gasto em torno de 6 bilhões de dólares, se forem considerados cerca de 21 milhões de hectares cultivados. Além disso, devem-se considerar os graves problemas ambientais provocados pelo efeito potencialmente poluidor do nitrato lixiviado no solo, resultante do uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados (CAMPO; HUNGRIA, 2000).

Em relação ao uso de inoculantes para obter altas produtividades na cultura da soja, obteve-se resultados em levantamentos realizados no período das últimas dez safras, onde mostram que a reinoculação (inoculação em cada safra) pode proporcionar ganhos na produtividade de grãos de soja - tanto no sistema convencional como no sistema de semeadura direta (podendo alcançar aumento de até 22% em produtividade). Isso reforça a recomendação da prática, que deve ser feita a cada cultivo, mesmo em áreas tradicionalmente cultivadas com soja. Em outros estados do País, os incrementos na produtividade também têm sido evidentes, variando entre 4,5% e 8% (EMBRAPA, 2001).

Nesse sentido, a prática da inoculação de sementes com *Bradyrhizobium japonicum* deve ser considerada pelos produtores de soja, uma vez que é uma técnica economicamente viável, com respostas positivas em termos de aumento de produtividade da cultura (CAMPOS, 1999; DORNELLES et al., 2006; CAMPOS; GNATTA, 2006).

### **2.3 Uso de inoculantes e eficiência na fixação biológica de nitrogênio na cultura de soja**

A inoculação é o processo no qual são colocados rizóbios (bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico) em contato com as sementes, em que o inoculante é o veículo que contém as bactérias. O uso de inoculantes em sementes de soja gera freqüentes dúvidas dentro do cenário agrícola, pois há divergências técnicas em relação à necessidade de complementação de produtos nitrogenados durante o ciclo da cultura, mesmo utilizando inoculantes para a fixação do nitrogênio atmosférico (ALBINO; CAMPO, 2001; CAMPOS; HUNGRIA; TEDESCO, 2001).

Ensaio conduzidos nas principais regiões produtoras de soja do país demonstram que a aplicação de fertilizantes nitrogenados, mesmo com dose inicial de arranque, não resulta em aumentos significativos na produtividade de grãos da cultura de soja (URQUIAGA; BODDEY; NEVES, 1999).

A cultura de soja apresenta uma elevada demanda de nitrogênio devido aos altos teores de proteínas (cerca de 40%) encontrados nos grãos. Estima-se que sejam necessários em torno de 240 kg de nitrogênio para a produtividade de 3.000 kg.ha<sup>-1</sup> de soja. As fontes de nitrogênio capazes de suprir tal demanda se restringem aos fertilizantes nitrogenados e ao fornecimento pelo



processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>). Considerando o baixo aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas (em torno de 50%) seria necessária uma quantidade estimada em 480 kg de nitrogênio para a obtenção da produtividade citada. Essa quantidade de nitrogênio seria equivalente a 1.067 kg de uréia, o que tornaria a cultura da soja economicamente inviável no Brasil (ALBINO; CAMPO, 2001).

As recomendações técnicas para a cultura de soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina indicavam no ano de 2000 a utilização da quantidade mínima de inoculante preconizada pelo fabricante, de modo a atingir 80.000 células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. por semente. Em áreas de primeiro ano de cultivo, era indicado utilizar o dobro desta recomendação. Em 2004, essas recomendações passaram para 300.000 células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. por semente e em 2006 a recomendação exigia 600.000 células viáveis. Esse fato reflete a importância dessa bactéria para o bom desempenho da cultura de soja e, portanto, é necessário estudar a influência dos produtos que usualmente são empregados no tratamento de semente conjuntamente com o *Bradyrhizobium* spp. (REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 1999).

#### **2.4 Eficiência do uso combinado de fertilizantes e inoculantes via tratamento de sementes**

Nos últimos anos tem aumentado a disponibilidade de produtos comerciais contendo micronutrientes, mas resultados experimentais têm demonstrado grande variabilidade, tornando esse tema contraditório. Por outro lado, o aumento na produtividade de soja com conseqüente diminuição do custo relativo no uso de micronutrientes e a expectativa de ganhos em escala, tem motivado produtores a utilizar formulações com micronutrientes, principalmente os que contêm cobalto e molibdênio, por sua influência na fixação simbiótica de nitrogênio na soja (ALBINO; CAMPO, 2001; HENNING, 1996; HENNING et al., 2003).

Respostas a micronutrientes têm sido mais freqüentes nas condições de cerrado, onde Broch e Fernandes (1999) mostraram que na média de 12 estudos com micronutrientes aplicados via semente, todos os tratamentos obtiveram aumento de produtividade em relação à testemunha, chegando a atingir aumento de 6,5 sacas.ha<sup>-1</sup>. No entanto, no sul do Brasil, a resposta à aplicação de micronutrientes depende muito da combinação de uma série de fatores, ainda não bem estudados (SANCHOTENE et al., 2006). Por isso, há a necessidade de implementação de novas pesquisas que auxiliem técnicos e produtores na tomada de decisão sobre o uso de

micronutrientes, embora se deva considerar que este tema sempre será objeto de discussão para cada situação, evitando-se generalização.

O uso intensivo do solo com a cultura de soja e a falta de manejo adequado tem provocado reduções dos teores de matéria orgânica e aumentado a acidez dos solos. Como consequência, a ocorrência de deficiência de alguns micronutrientes, essenciais à cultura de soja e, especialmente ao processo de fixação simbiótica, como o molibdênio e o cobalto (HENNING, 1996; HENNING et al., 2003).

Tratamentos de sementes com fertilizantes que contêm zinco e nitrogênio, aplicados em associação com inoculantes (DOMIT et al., 1990), reduziram a nodulação das plantas de soja, interferindo no crescimento inicial da cultura. Por outro lado, fertilizantes que continham em sua formulação cobalto e molibdênio incrementaram a nodulação e as plantas apresentaram maior desenvolvimento inicial da parte aérea e do sistema radicular em comparação com a testemunha sem inoculante ou com a testemunha apenas com inoculante e sem o fertilizante (SPAINK, 1995; SANCHOTENE et al., 2006).

Adubações com fertilizantes que continham nitrogênio prejudicaram a fixação simbiótica, razão pela qual solos com alto teor de matéria orgânica mineralizada, interferem na nodulação inicial e, conseqüentemente, na eficiência da fixação do nitrogênio pelas colônias de bactérias que infectam a planta através da atividade nos nódulos radiculares (DORNELLES et al., 2006; HENNING, 1996; HENNING et al., 2003).

Apesar da capacidade da fixação biológica em suprir toda demanda de nitrogênio da cultura de soja, diversos fatores podem impedir a expressão da máxima eficiência desse processo. Tanto a semeadura quanto o preparo do solo geram mobilização, que favorece a mineralização da matéria orgânica. Esse nitrogênio mineralizado pode ser suficiente para limitar a fixação biológica, mas insuficiente para suprir toda necessidade da cultura (BIZARRO et al., 2001).

O molibdênio é um elemento encontrado em toda a crosta terrestre, principalmente em solos provenientes de rochas sedimentares (BATAGLIA; FURLANI; VALADARES, 1976). Porém, seu teor no solo é sempre baixo, excedendo 0,04% somente em depósitos marinhos (GUPTA; LIPSETT, 1981). Por causa de sua baixa concentração nos solos e utilização sem a devida reposição, o molibdênio tem se esgotado, tornando-se comum a sua deficiência, principalmente nos solos de cerrado (SFREDO et al., 1997).

Por participar da estrutura e ser ativador de diversas enzimas, o molibdênio é de fundamental importância a todos os vegetais (ALBINO; CAMPO, 2001). Essa importância aumenta no caso da soja, que tem a capacidade de estabelecer simbiose com microrganismos fixadores de  $N_2$  pertencentes à família Rhizobiaceae. Esses microrganismos infectam as raízes da soja e formam os nódulos, em cujo interior é sintetizado um complexo enzimático, denominado nitrogenase, que rompe a tripla ligação existente entre os átomos de nitrogênio que formam a molécula do  $N_2$  e utilizam esses átomos para produzir duas moléculas de amônia ( $NH_3$ ), que são fornecidas à planta, para sintetizar os compostos nitrogenados. As fabáceas, em contrapartida, fornecem carboidratos aos microrganismos. Entre os microrganismos da família Rhizobiaceae, comumente chamados de rizóbios, as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* nodulam a soja.

A importância do molibdênio no processo de fixação biológica de nitrogênio foi, primeiramente, descrita por Bortels (1930), que demonstrou que *Azotobacter vinelandii*, quando inoculado em meio de cultura sem nitrogênio combinado, necessitava de molibdênio para crescer, o que não ocorria se a fonte de nitrogênio do meio de cultura fosse o amônio. Posteriormente, Bulen e LeConte (1966) demonstraram que a nitrogenase purificada continha molibdênio. Hoje, é sabido que o molibdênio faz parte do co-fator ferro e molibdênio, o grupo prostético da fração dinitrogenase do complexo enzimático nitrogenase (MARTENS; WESTERMANN, 1991).

A soja requer grandes quantidades de nitrogênio dado o seu elevado teor de proteína e, na ausência da simbiose com *Bradyrhizobium* spp., chegaria a ser uma cultura inviável diante dos custos elevados que o agricultor teria com fertilizantes (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Com o surgimento do problema de deficiência de molibdênio no solo, tornou-se necessário fornecê-lo à soja através da adubação mineral (SFREDO et al., 1997). A aplicação pode ser feita de diversas formas. No passado, o fornecimento era realizado quando a semente recebia as substâncias necessárias na forma de um pélete que a envolvia (RUSCHEL; ROCHA; PENTEADO, 1970).

Atualmente, essa prática não vem sendo adotada, pois o pélete pode dificultar as trocas gasosas da semente, prejudicando-a, e diversas outras formas de aplicação de molibdênio têm sido descritas. Alguns autores afirmam que o melhor é aplicar o molibdênio no solo, antes da semeadura (JOHANNES; GUNARTO, 1987; VARGAS; RAMIREZ, 1989). Entretanto, em face da sua imobilização no solo, a sua eficiência seria muito inferior, requerendo, para isso,

quantidades necessárias de molibdênio superiores em dez vezes, para equiparar eficiência com a de outros métodos. Hegazy, El Hawary e Ghobrial (1990), Yanni (1990) e Amara e Nasr (1995) afirmam ter obtido melhores resultados quando o molibdênio foi aplicado via pulverização foliar. Em face da facilidade, do baixo custo e da eficiência de aplicação, outra alternativa de aplicação do molibdênio é via semente, por ocasião da semeadura, imediatamente antes do inoculante (CAMPOS, 1999).

Verifica-se, em alguns trabalhos, que as principais fontes de molibdênio são o molibdato de sódio, molibdato de amônio, ácido molíbdico e trióxido de molibdênio. Atualmente, existem, no mercado, diversos produtos comerciais fornecedores de micronutrientes, com as mais variadas formulações. Sfredo et al. (1997), trabalhando com alguns desses produtos, verificaram que a adição do molibdênio nas sementes aumentou a produtividade de soja em até 480 kg.ha<sup>-1</sup>, provando, assim, a importância desse nutriente para a cultura de soja.

A recomendação atual de aplicação do molibdênio em soja é via semente antes da aplicação do *Bradyrhizobium* spp. Os produtos a base de molibdênio podem ser líquidos ou sólidos. Os inoculantes podem ser liofilizados, líquidos ou turfosos. Para uma boa aderência e distribuição desses produtos nas sementes, a recomendação é umedecer as sementes com 300 mL de solução de sacarose a 10%. Logo, na prática, se o produto contendo molibdênio é líquido e o inoculante é turfoso, ou vice-versa, utiliza-se o produto líquido, completando seu volume para 300 mL com solução de sacarose, aplicá-lo nas sementes para umedecer, e a seguir, após homogeneização, aplicar o pó. Se ambos os produtos forem líquidos, eles são misturados e aplicados nas sementes. Assim, a bactéria estará em contato com o produto contendo molibdênio (ALBINO; CAMPO, 2001).

Doses altas de molibdênio afetam o *Bradyrhizobium* spp., podendo diminuir o número de células viáveis na superfície da semente e prejudicar a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio, refletindo negativamente na produtividade (TONG; SADOWSKY, 1994).

Preferencialmente, pela facilidade de aplicação, o inoculante líquido vem substituindo os inoculantes turfosos (CAMPOS, 1999). Como a turfa tem papel importante na proteção do *Bradyrhizobium* spp. por ocasião da inoculação e após ela, a sobrevivência do *Bradyrhizobium* spp. é ainda mais reduzida com o uso dos inoculantes líquidos. Por outro lado, não se conhece a tolerância das estirpes de *Bradyrhizobium* Semia-587, Semia-5019, Semia-5079 e Semia-5080,

recomendadas para o uso em inoculantes comerciais na cultura da soja, em relação às fontes de molibdênio.

Entre os fatores que podem limitar a fixação biológica de nitrogênio e, conseqüentemente, a produtividade de soja, está a competição por sítios nodulares entre estirpes utilizadas nos inoculantes e os rizóbios do solo (CAMPOS, 1999).

O efeito da rizosfera, tensão da água, pH do solo (HOWIESON; ROBSON; ABBOTT, 1992), salinidade, temperatura, toxinas e predadores também podem afetar a nodulação e/ou a fixação do N<sub>2</sub> de fabáceas (leguminosas) junto às diferentes estirpes de *Rhizobium* spp. (HUNGRIA; BOHRER, 2000; HUNGRIA et al., 2005).

A soja é uma fabácea (leguminosa) introduzida e uma das poucas espécies que se associa com *Bradyrhizobium japonicum*. Portanto, é pouco provável a ocorrência natural dessa bactéria em nossos solos, havendo, entretanto possibilidades de que algumas das estirpes introduzidas no solo, juntamente com as sementes ou por intermédio de inoculação artificial, sobrevivam e se estabeleçam no meio (ZUBERER, 1994; YUSUF; SIEMENS; BULLOCK, 1999).

## 2.5 Especificidade da infecção *Bradyrhizobium japonicum* na planta de soja

A especificidade hospedeira representa a habilidade de uma estirpe de rizóbio em induzir a nodulação e, ou, fixar N<sub>2</sub> quando associada a variedades cultivadas ou espécies do hospedeiro específico, sendo por isso uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes (PERES; SUHET; VARGAS, 1989).

O mecanismo de reconhecimento na associação do rizóbio com a fabácea (leguminosa) obedece a um complexo conjunto de informações genéticas entre a planta e bactéria (YUSUF; SIEMENS; BULLOCK, 1999).

Os rizóbios são na realidade parasitas extremamente refinados, que por meio de uma evolução conjunta com o hospedeiro transformaram o processo parasitário em simbiótico, causando muito mais benefícios do que danos (CARDOSO; FREITAS, 1992). Tal afirmação se baseia no fato de que vários genes necessários para parasitismo e amplitude de hospedeiros em *Rhizobium* são similares àqueles presentes em *Agrobacterium*, uma bactéria patogênica em plantas, também classificada na família Rhizobiaceae (PEREIRA, 2005).

Na década de 70, com a expansão da cultura de soja na região do Cerrado brasileiro, a variedade cultivada de soja IAC-2 passou a ser recomendado para a semeadura nessa área. Porém, a alta especificidade hospedeira dessa variedade cultivada dificultou o estabelecimento de

uma simbiose eficiente. Assim, foram pesquisadas novas estirpes que apresentassem capacidade de nodular a variedade cultivada de soja IAC-2 e bom potencial de competição com a população de rizóbios naturalizada nos solos. Foram selecionadas duas variantes: a CPAC-7 (Semia-5080), obtida após subcultivos da estirpe Semia-586 (CB-1809), e a variante CPAC-15 (Semia-5079) isolada de campo de cerrado, considerada uma mutante natural da Semia-566 (BR-40) (BODDEY; HUNGRIA, 1997).

A especificidade hospedeira em *B. japonicum* estaria relacionada, pelo menos em parte, com a presença do radical 2-O-metilfuose na estrutura básica do oligossacarídeo lipoquitínico (LCO) nessa espécie (IKUTA, 1995).

Ainda que se tenham informações sobre a influência das substituições no fator Nod, nenhuma correlação exata pode ser feita entre o tipo de LCO produzido pelo rizóbio e a planta que ele nodula. Por exemplo, *Rhizobium etli* e *R. loti* têm o mesmo fator Nod, mas nodulam com espécies distintas de feijoeiro (CARDENAS et al., 1995). O mesmo foi observado com duas estirpes de *R. leguminosarum*, que embora tenham o mesmo fator Nod, também nodulam com espécies diferentes (ORGAMBIDE et al., 1995).

Outro exemplo interessante que pode ser citado é a nodulação de feijoeiro com *R. tropici* e *R. etli*, porém nesse caso existem diferentes tipos de fator Nod (POUPOT et al., 1993). Contudo, cada vez mais se acredita que tal especificidade esteja relacionada com um conjunto de fatores e não com um único fator (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

As proteínas NodD apresentam comprovada habilidade para reconhecer diferentes indutores. Contudo, tais proteínas não são as únicas determinantes da especificidade hospedeira que uma estirpe revela, uma vez que, em várias etapas do processo de infecção, são requisitados componentes adicionais da parede celular (EPS e LPS) e, em alguns casos, a secreção de proteínas específicas também se faz necessária para que ocorra um completo processo de infecção e formação dos nódulos (HOWIESON; ROBSON; ABBOTT, 1992).

A especificidade entre parceiros compatíveis teoricamente minimizaria as chances de infecção por patógenos e formação de associações não efetivas que seriam prejudiciais a ambos os simbiontes (CAMPOS; GNATTA, 2006). Contudo, Spaink (1995) relatou que moléculas liberadas por não hospedeiros também são capazes de induzir os genes *nod*, por exemplo, duas xantonas presentes em *Haploclathra* spp. induziram genes de nodulação em *B. japonicum*.

Porém, atualmente só existem especulações sobre o significado ecológico da indução dos genes de nodulação por não hospedeiros (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Assim, baseado nos diversos estudos envolvidos com a especificidade hospedeira de rizóbios e bradirrizóbios, torna-se evidente que um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro parece ser a exceção e não a regra (HUNGRIA et al., 2005).

A escolha de estirpes que apresentem baixa especificidade é recomendável, uma vez que a variabilidade genética entre as variedades cultivadas de fabáceas (leguminosas) têm sido apontada como uma das causas que afetam a eficiência fixadora de  $N_2$  das estirpes durante a simbiose (PERES; SUHET; VARGAS, 1989).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Experimento I: estudo do efeito da aplicação isolada ou em mistura de macronutrientes e micronutrientes com fungicidas no desenvolvimento de *Bradyrhizobium* em meio de cultura YMA

##### 3.1.1 Local e época de realização dos experimentos

O experimento (experimento I) foi conduzido no período de 5 a 23 outubro 2007, no laboratório do Departamento de Biologia na Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria-RS, no intuito de estudar o efeito da aplicação isolada ou em mistura de macronutrientes e de micronutrientes com fungicidas no desenvolvimento de *Bradyrhizobium* em meio de cultura YMA.

##### 3.1.2 Descrição dos tratamentos

Os tratamentos, com a especificação das doses (em mL do produto comercial por 100 kg de sementes) e dos produtos (aplicação isolada ou em mistura de micronutrientes com fungicidas), estão descritos na Tabela 1.

Foram avaliados os seguintes produtos: (i) composto 1, (ii) composto 2, (iii) carboxina, (iv) thiram e (v) carbendazim.

O Composto 1 possui em sua composição básica 14,0% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1,0% de nitrogênio, 0,50% de K<sub>2</sub>O e 5,0% de matéria orgânica. O Composto 2 possui em sua composição básica: 6,0% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1,0% de nitrogênio, 1,0% de cobalto, 13,0% de molibdênio e 4,0% de matéria orgânica.

Designado pelo nome comum de Carboxina {5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathin-3-carboxamide + tetramethylthioperoxydi carbonic diamide ( $[[(\text{CH}_3)_2\text{N}]\text{C}(\text{S})]_2\text{S}_2$ )}, pertence ao grupo químico carboxanilida + dimetilditiocarbamato, o qual é formulado como suspensão concentrada (SC), com o nome comercial de Vitavax-Thiram 200 SC, contendo os ingredientes ativos carboxin (200 g.L<sup>-1</sup> do produto comercial) e Thiram (200 g.L<sup>-1</sup> do produto comercial) (classe toxicológica IV - faixa verde).

Designado pelo nome comum de Thiram {tetramethylthioperoxydicarbonic diamide ( $[[(\text{CH}_3)_2\text{N}]\text{C}(\text{S})]_2\text{S}_2$ )}, pertence ao grupo químico dimetilditiocarbamato, o qual é formulado como suspensão concentrada (SC), com o nome comercial de Thiram 480 TS e contendo 480



gramas do ingrediente ativo thiram por litro de produto comercial (classe toxicológica IV - faixa verde).

Designado pelo nome comum de Carbendazim {methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate}, pertence ao grupo químico benzimidazol, o qual é formulado como suspensão concentrada (SC), com o nome comercial de Derosal e contendo 500 gramas do ingrediente ativo carbendazim por litro de produto comercial (classe toxicológica III – faixa azul).

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos e doses (mL do produto comercial por 100 kg de sementes) em sementes de soja variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007

Id	Tratamento	Dose
1	Composto 1 (pH final: 1,5)	150
2	Composto 2 (pH final: 4,81)	150
3	Composto 1 + Carboxina (pH final: 1,74)	150 +250
4	Composto 2 + Carboxina (pH final: 5,08)	150 + 250
5	Composto 1 + Água - pH 4,4 (pH final: 1,69)	150 + 150
6	Composto 1 + Thiram + CoMo + Carbendazim (pH final: 2,12)	150+140+150+60
7	Composto 1 + Thiram (pH final: 1,87)	150 + 300
8	Composto 2 + Água pH 4,4 (pH final: 5,07)	150 + 150
9	Composto 2 + Thiram (pH final: 4,96)	150 + 300
10	Composto 2 + Thiram + Carbendazim (pH final: 5,10)	150 + 140 + 60
11	Testemunha	-

### 3.1.3 Avaliação do efeito do tratamento de sementes

A avaliação do efeito do tratamento de sementes de soja sob o inóculo de *Bradyrhizobium* foi realizada através do método da quantificação das unidades formadoras de colônias, que é considerado o método mais adequado para este tipo de experimento (HUNGRIA, 1994; IKUTA, 1995).

### 3.1.4 Primeira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium*

Nessa primeira etapa, foi adicionado 0,4 mL de água destilada e esterilizada para a hidratação dos 80 g de sementes esterilizadas. Em seguida foram adicionados os tratamentos nas

doses correspondentes (Tabela 2), seguida da adição de uma alíquota de 0,24 mL de inoculante por frasco. Na seqüência de cada um dos passos, os frascos foram submetidos à agitação manual por 1 minuto (Figura 1). Feito o tratamento, as sementes ficaram em repouso por 4 horas.

Tabela 2 - Doses dos fungicidas (F, mL por 80 g de sementes) e inoculante (I, mL por 80 g de sementes) aplicadas no tratamento de semente de soja variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007

Tratamento	F	I
1	0,12	0,24
2	0,12	0,24
3	0,32	0,24
4	0,32	0,24
5	0,24	0,24
6	0,40	0,24
7	0,36	0,24
8	0,30	0,24
9	0,36	0,24
10	0,35	0,24
11	-	0,24

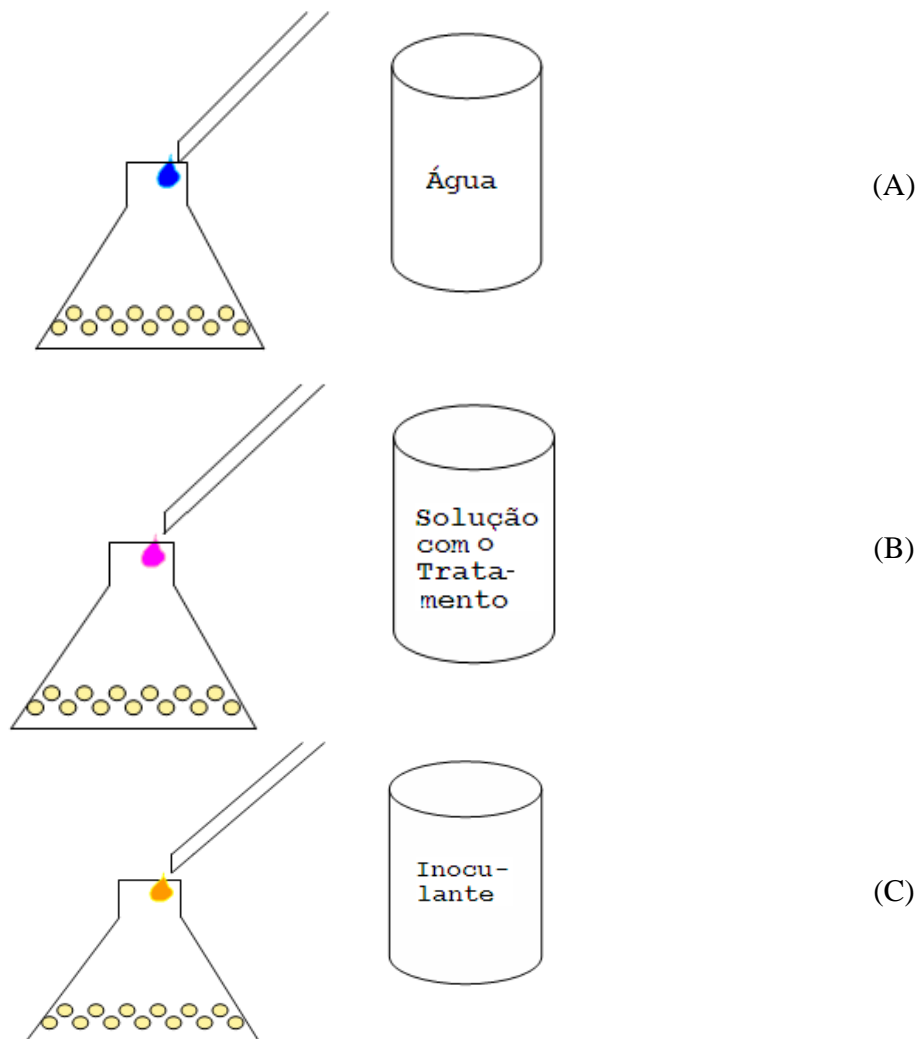


Figura 1 - Primeira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.: (A) hidratação das sementes: (i) adição de 0,4 mL de água; e (ii) agitação manual por 1 minuto; (B) tratamentos: (i) adição da dose correspondente do tratamento; e (ii) agitação manual por 1 minuto; e (C) inoculação: (i) adição de 0,24 mL de inoculante; e (ii) agitação manual por 1 minuto. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002)

### 3.1.5 Segunda etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium*

Terminado o período de 4 horas, foram adicionados 200 mL de água por frasco e deixou-se incubado por mais uma hora e meia, formando a solução matriz para as diluições (Figura 2).

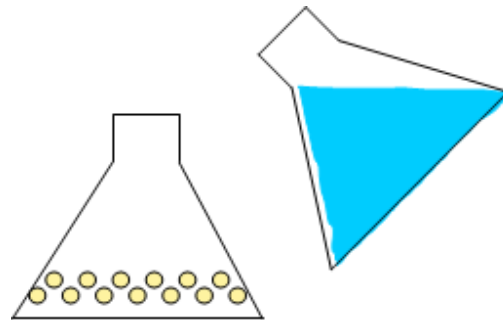


Figura 2 - Incubação (segunda etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.): (i) adição de 200 mL de água destilada e estéril; (ii) agitação manual por 1 minuto; e (iii) incubação em temperatura ambiente por uma hora e meia. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002)

### 3.1.6 Terceira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium*

Nessa etapa, foram feitas as diluições para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 3).

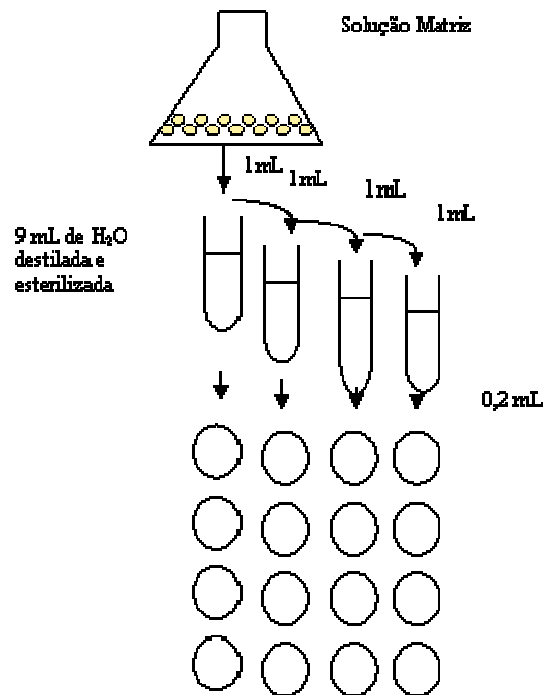


Figura 3 - Terceira etapa do processo de elaboração do protocolo de contagem de colônias de *Bradyrhizobium* spp.: diluições para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007. Metodologia adaptada de Temprano et al. (2002)

Foi retirada uma alíquota de 1 mL da solução e feita as diluições sequenciais. De cada diluição foi retirado 0,2 mL para as placas contendo meio YMA. As bactérias foram incubadas por onze dias a 28°C.

### 3.1.7 Procedimento de cálculo do número de *Bradyrhizobium* spp.

Para o cálculo do número de bactérias após inoculação das sementes foi utilizado o método das diluições seriadas e das placas de contagem. O princípio do método se baseia no fato de que uma célula presente no inoculante dará origem a uma colônia no meio de cultura da placa. Logo, cada colônia que for visualizada na placa equivale a uma célula ou unidade formadora de colônia de *Bradyrhizobium* spp.

Cabe salientar que se não houvessem diluições do inoculante, o número de UFC (unidades formadoras de colônias) seria tão grande que uma massa espessa recobriria o meio de cultura da placa de Petri, indicando que as inúmeras colônias teriam coalescido, impossibilitando sua contagem. Essa é a razão pela qual são necessárias várias diluições, conforme ilustrado na figura acima. Para *Bradyrhizobium*, um número de colônias por placa menor que 150 e maior que 5 permite a contagem e utilização para cálculos.

Na metodologia aplicada, 0,24 mL de inoculante (equivalente a 150 mL por 50 kg de semente) foi distribuído sobre 80 g de sementes de soja. O *Bradyrhizobium* spp. presente nesse inoculante foi posteriormente diluído em 200 mL de água. Retirando 1 mL dessa suspensão e diluindo novamente em tubos contendo 9 mL de água estéril, tem-se nova diluição. Assim, até quatro diluições sucessivas foram realizadas. De cada tubo foi pipetado, 0,2 mL de suspensão e essa foi esparramada sobre as placas, em seis repetições.

Para melhor ilustrar, tome-se como exemplo os resultados do tratamento 6. Nesse, verificou-se o crescimento de 45, 61, 19, 31, 22 e 19 colônias nas placas das repetições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, da diluição  $10^{-3}$ . Na diluição  $10^{-4}$  cresceram 4, 2, 2, 3,2 e 2 colônias, nas repetições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Multiplicando a média  $[(45+61+19+31+22+19)/6 = 32,8333]$  da diluição  $10^{-3}$  pelo fator de diluição<sup>1</sup> (FD) 4.166.666,667 (ver nota de rodapé), tem-se que, para essa diluição, o número de células (UFC - unidades formadoras de colônias) por mL de inoculante é 136.805.416. Sendo uma diluição decimal, resultado similar deve ser esperado na próxima diluição. Assim, tomando-se a média  $[(4+2+2+3+2+2)/6 = 2,5]$  de colônias, multiplicando-se pelo FD 41.666.666,667, tem-se o número de 104.166.666 células. Tomando-se a média dessas duas determinações  $[(136.805.416+104.166.666)/2]$ , tem-se que o número médio de células de rizóbio presente em cada mL de inoculante, e/ou sobreviventes ao tratamento, é de 120.486.039.

O cálculo do número de células presentes em cada semente é feito inicialmente pela determinação do número de sementes contidas em 80 g que foram tratadas. Assim, tem-se que 120.486.039 em 1 mL de inoculante equivalem a 28.916.653 células em 0,24 mL de inoculante. Sendo esse volume (0,24 mL) aplicado a 80 g de sementes (aproximadamente 672 sementes), pode-se estabelecer que o número de células de rizóbio por semente, nesse tratamento, é de 28.916.653 células por 672 sementes ou 43.030 bactérias por semente (Tabela 5).

### **3.2 Experimento II: estudo do efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de bactérias do grupo *Rhizobium* em condições de campo**

#### **3.3 Local e época de realização do experimento**

O experimento (experimento II) foi conduzido no período de dezembro de 2007 a abril de 2008 (safra agrícola 2007/2008) na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria-RS.

##### **3.3.1 Análise química e granulométrica da amostra representativa do solo**

Os resultados da análise química e granulométrica do solo da área experimental, cuja amostra foi coletada em 1 de outubro de 2007, encontra-se na Tabela 3.

---

<sup>1</sup> O fator de diluição é calculado para cada diluição do tratamento: (i) para a diluição  $10^{-1}$ : diluição inicial (0,24/200) x 1mL/9+1 mL de água (0,1) x quantidade do inóculo (0,2) = 0,000024 = fator de diluição (FD), o inverso da diluição(1/D) é 41.666,66667; (ii) para a diluição  $10^{-2}$ : há duas diluições de 1 mL em 9+1 mL. Assim, FD = 416.666,6667; (iii) para a diluição  $10^{-3}$ : há três diluições de 1 mL em 9+1 mL. Assim, FD = 4.166.666,667; e (iv) para a diluição  $10^{-4}$ : há três diluições de 1 mL em 9+1 mL. Assim, FD = 41.666.666,667.

Tabela 3 - Análise química e granulométrica da amostra representativa do solo no local do experimento. Laboratório do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 1 de outubro de 2007

Item	Valor	Item	Valor
pH (H <sub>2</sub> O)	4,8	Relação Ca/K	38,8
pH (SMP)	5,47	Relação Mg/K	13,5
P (mg.L <sup>-1</sup> )	7,2	CTC efetiva (cmol <sub>c</sub> .L <sup>-1</sup> )	10,4
K (mg.L <sup>-1</sup> )	65,0	Argila (%)	19
Al (cmol <sub>c</sub> .L <sup>-1</sup> )	0,2	Classe Textural	4
Relação Ca/Mg	3,3	Matéria Orgânica (%)	1,1

### 3.3.2 Variedade e tratos culturais

Foi utilizada a espécie *Glycine max* L. Merrill, variedade cultivada de soja FT-Abyara.

Antes da semeadura foi realizada escarificação do solo no intuito de minimizar o problema de compactação antes do preparo do solo. Logo após, foram aplicados 40 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 80 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no sulco de semeadura.

Depois de implantada a cultura foi realizado o manejo de plantas daninha através de duas capinas manuais na área experimental com o objetivo de manter a área sem competição com plantas daninhas.

No estágio R<sub>5,3</sub>, segundo a escala fenológica proposta por Fehr e Caviness (1977), foi aplicado o fungicida difenoconazol (Score 250 CE) na dose de 150 mL.ha<sup>-1</sup> (calda de 150 L.ha<sup>-1</sup>).

Durante o período experimental ocorreu uma estiagem de 14 dias sem chuvas quando a cultura se encontrava entre os estádios V<sub>4</sub> e V<sub>6</sub> (segundo a escala fenológica proposta por Fehr e Caviness, 1977).

### 3.3.3 Descrição dos tratamentos

Foram avaliados os seguintes produtos: (i) composto 1, (ii) composto 2, (iii) composto 3, (iv) thiram e (v) carbendazim. O composto 3 possui em sua composição básica: 16,5% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 6,5% de nitrogênio, 0,3% de K<sub>2</sub>O, 2,0% de zinco e 8,4% de matéria orgânica.

Tabela 4 - Descrição dos tratamentos e doses (mL do produto comercial por 100 kg de sementes).  
Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	Dose
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	150 + 140 + 60 + 150
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	150 + 140 + 60 + 150
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	150 + 140 + 60 + 150
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	150 + 140 + 60
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	150 + 140 + 60
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	150 + 140 + 60
7	Composto 3 + Inoculante	150 + 150
8	Composto 1 + Inoculante	150 + 150
9	Composto 2 + Inoculante	150 + 150
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	140 + 60 + 150 + 150
11	Composto 3	150
12	Composto 1	150
13	Composto 2	150
14	CoMo + Inoculante	150 + 150
15	Inoculante	150
16	Testemunha	-

O tratamento das sementes foi realizado manualmente, utilizando-se um tambor rotativo, sendo que primeiramente foi realizado o tratamento das sementes com os fertilizantes e/ou fungicidas e por último o inoculante, conforme preconizado nas recomendações técnicas da XXVIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul (2000). Após cada tratamento, o tambor foi devidamente descontaminado para a preparação do tratamento seguinte.

Cada unidade experimental apresentou 2,25 m de largura (cinco linhas com espaçamento de 0,45 m) por 10 m de comprimento. A área de cada parcela totalizou de 22,5 m<sup>2</sup> e a área útil foi de 10,8 m<sup>2</sup>, pois para cada análise foi descartado 1 m de bordadura de cada linha.

### 3.3.4 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos e doses dos produtos testados encontram-se na Tabela 4.



Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância. A comparação de médias foi efetuada por intermédio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### **3.3.5 Avaliações efetuadas**

Por intermédio de amostras de solo com plantas de soja aos 25, 40 e 60 dias após semeadura, foram avaliados o comprimento das raízes, a altura de planta, número de nódulos por planta, a massa de matéria seca de raízes e a massa de matéria seca de parte aérea.

A colheita foi realizada no dia 10 de abril de 2008, manualmente, na área de 10,8 m<sup>2</sup> de cada unidade experimental (três linhas centrais de 0,45 m de espaçamento por 8 m de comprimento). Após a trilha, limpeza e pesagem dos grãos, os dados foram corrigidos para 13% de umidade e convertidos em quilogramas por hectare (kg.ha<sup>-1</sup>).

A avaliação dos parâmetros microbiológicos permitem inferir a influência do tratamento de sementes com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de bactérias do grupo rizóbio inoculadas em sementes de soja, bem como a influência desse tratamento no número de bactérias do solo. Os tratamentos com fungicidas e micronutrientes foram aplicados sobre as sementes, nas doses recomendadas em cultivos comerciais.

Para avaliação da influência dos tratamentos sobre a microflora bacteriana do solo, as sementes tratadas foram incubadas por 3 dias em frascos contendo solo úmido. Após esse período, o solo, contendo as sementes, foi diluído em água estéril e agitado para dispersar as células bacterianas. Imediatamente após, foi quantificado o número de bactérias viáveis pelo método das placas de contagem. A sobrevivência de bactérias rizóbio sob influência dos diferentes tratamentos foi avaliada pela inoculação e tratamento de sementes seguida da dispersão em água e cultivo. Um expressivo efeito de tratamento foi verificado em ambos os experimentos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I: estudo do efeito da aplicação isolada ou em mistura de micronutrientes com fungicidas no desenvolvimento de *Bradyrhizobium* spp. em meio de cultura YMA

Conforme ilustram as Tabelas 5, 6 e 7, todos os tratamentos diminuíram o número de células de *Bradyrhizobium* spp. por mL de inoculante e por semente de soja. O tratamento 2 (composto 2 na dose de 150 mL por 100 kg de sementes) manteve 306.969 células de *Bradyrhizobium* spp. por semente, dentro do valor sugerido pelas Recomendações Técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 2000).

Analisando o efeito dos tratamentos em relação a testemunha observa-se que o Composto 1 + Thiram (pH final: 1,87) foi o que proporcionou maior redução no número de células *Bradyrhizobium* spp. por mL de inoculante (Tabela 7). De modo geral, os tratamentos envolvendo fungicidas diminuíram significativamente o número de células de *Bradyrhizobium* spp. Lal (1988), realizando um trabalho visando estabelecer a compatibilidade de fungicidas com o *Bradyrhizobium* spp., verificou que os fungicidas vitavax e benomyl ocasionaram efeito letal, enquanto que o thiram e o captan apresentaram efeito intermediário. De acordo com esses autores, o efeito dos fungicidas utilizados é a redução na atividade da enzima nitrogenase, que teve como consequência a diminuição do número de células de *Bradyrhizobium* spp. Em trabalho semelhante, Hashem et al. (1997) verificaram a sobrevivência da raça de *Bradyrhizobium* spp. USDA-3384 e USDA-3456 quando utilizaram vitavax e benomyl no tratamento de sementes de *Arachis hypogaea* na dose de 3 g.kg<sup>-1</sup> de semente.

Esses resultados contrastam com Bueno Meyer e Souza (2003), que avaliaram o efeito do fungicida thiram e outros fungicidas (thiabendazol + thiram, metalaxyl, difenoconazol + thiram, carbendazin + thiram, fludioxonil + metalaxyl, tiofanato metílico + tolylfluanid, thiabendazol, captan) na sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019) e de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079), e não evidenciaram nenhuma redução na nodulação em plantas de soja, em ensaio conduzido em casa-de-vegetação, em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*.

Em relação à acidez da solução, alguns trabalhos têm demonstrado melhor adaptação de bactérias quando previamente crescidas em meios de cultura levemente ácidos, fenômeno conhecido como *acid habituation* (GOODSON; ROWBURY, 1989a,b) ou *adaptive tolerance response* (FOSTER; HALL, 1990, 1991).

Essas observações aumentam os questionamentos sobre as condições de cultivo apropriadas para o preparo de inoculantes para solos ácidos, pois bactérias crescidas em pH 5,0 podem ter maior chance de sobreviver em solos ácidos do que aquelas crescidas em pH 7,0 (O'HARA; GLENN, 1989).

Miguel e Moreira (2001) verificaram maior produção de exopolissacarídeos e de número de unidades formadoras de colônias por estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (Br29, Br 4406, SEMIA 587 e INPA 401-11B) crescidas em meio de cultura extrato de levedura (yeast) e manitol (YM) com pH inicial igual a 6,0, em comparação com os outros tratamentos (pH inicial entre 5,0 e 6,8).

Tabela 5 - Efeito dos tratamentos sobre o número de células de *Bradyrhizobium* spp. por mL de inoculante ( $n_0$ ). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007

Id	Tratamento	$n_0$
1	Composto 1 (pH final: 1,5)	336.383.600c <sup>1</sup>
2	Composto 2 (pH final: 4,81)	859.513.200b
3	Composto 1 + Carboxina (pH final: 1,74)	130.202.800d
4	Composto 2 + Carboxina (pH final: 5,08)	145.647.600d
5	Composto 1+ Água (pH 4,4) (pH final: 1,69)	364.291.200c
6	Composto 1+ Thiram + CoMo + Carbendazim (pH final: 2,12)	120.486.039d
7	Composto 1 + Thiram (pH final: 1,87)	95.438.000d
8	Composto 2 + Água pH 4,4 (pH final: 5,07)	588.053.200bc
9	Composto 2 + Thiram (pH final: 4,96)	129.172.400d
10	Composto 2 + Thiram + Carbendazim (pH final: 5,10)	269.474.800cd
11	Testemunha	1.078.011.200 <sup>a</sup>
Coeficiente de variação		78,326%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 6 - Efeito dos tratamentos sobre o número de células de *Bradyrhizobium* spp. por semente de soja ( $n_1$ ). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007

Id	Tratamento	$n_1$
1	Composto 1 (pH final: 1,5)	120.137b <sup>1</sup>
2	Composto 2 (pH final: 4,81)	306.969a
3	Composto 1+ Carboxina (pH final: 1,74)	46.501c
4	Composto 2 + Carboxina (pH final: 5,08)	52.017c
5	Composto 1 + Água (pH 4,4) (pH final: 1,69)	130.104b
6	Composto 1 + Thiram + CoMo + Carbendazim (pH final: 2,12)	43.030c
7	Composto 1 + Thiram (pH final: 1,87)	34.085c
8	Composto 2 + Água pH 4,4 (pH final: 5,07)	210.019ab
9	Composto 2 + Thiram (pH final: 4,96)	46.133c
10	Composto 2 + Thiram + Carbendazim (pH final: 5,10)	96.241bc
11	Testemunha	385.004a
Coeficiente de variação		45,8935%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 7 - Efeito relativo (ER, %) do tratamento sobre o número de *Bradyrhizobium* spp. por semente de soja em relação à testemunha. Santa Maria, RS. 2007

Id	Tratamento	ER
1	Composto 1 (pH final: 1,5)	31
2	Composto 2 (pH final: 4,81)	80
3	Composto 1 + Carboxina (pH final: 1,74)	12
4	Composto 2+ Carboxina (pH final: 5,08)	14
5	Composto 1 + Água (pH 4,4) (pH final: 1,69)	34
6	Composto 1 + Thiram + CoMo + Carbendazim (pH final: 2,12)	11
7	Composto 1 + Thiram (pH final: 1,87)	9
8	Composto 2 + Água pH 4,4 (pH final: 5,07)	55
9	Composto 2 + Thiram (pH final: 4,96)	12
10	Composto 2 + Thiram + Carbendazim (pH final: 5,10)	25
11	Testemunha	100

#### **4.2 Experimento II: estudo do efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e fungicidas na sobrevivência de bactérias do grupo *Rhizobium* spp. em condições de campo**

Analisando o número de nódulos de *Bradyrhizobium* spp. por planta de soja, nota-se que a testemunha apresentou em todas as avaliações número inferior de nódulos por planta, quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 8).

Aos 30 e 50 dias após a semeadura, os maiores números de nódulos por planta de soja foram encontrados nos tratamentos composto 1 + thiram + carbendazim + inoculante, composto 1 + thiram + carbendazim, composto 1 + inoculante, composto 1, CoMo + inoculante e apenas inoculante, com variação de 50,3 a 63,2 aos 30 e 50 dias após a semeadura, respectivamente. Nos demais tratamentos, o menor número de nódulos por planta foi verificado na testemunha com 19,5 aos 30 dias após a semeadura e 39,7 a 43,2 nos tratamentos composto 2 + thiram + carbendazim e composto 2 + thiram + carbendazim + inoculante, respectivamente (Tabela 8).

Embora tenha sido observado efeito negativo dos fungicidas testados na fixação biológica em meio de cultura, tal efeito não foi evidenciado em todos os tratamentos testados a campo. De acordo com Rennie e Dubetz (1984), a aplicação de thiram, captan e carbathin não causa efeito negativo sobre a nodulação de soja.

Segundo Santha Lakshmi e Gupta (1997), o tratamento de sementes de soja com o fungicida tiofanato metílico proporcionou aumento no número e massa de nódulos em combinação com estirpes de rizóbio. No entanto, Bikrol, Saxena e Singh (2005) observaram decréscimo na atividade da nitrogenase quando sementes de soja foram tratadas com thiram em doses superiores a 100 g.mL<sup>-1</sup>. O mesmo ocorreu em relação o número e massa de matéria seca de nódulos.

Os resultados experimentais também comprovaram que os compostos que apresentaram cobalto e molibdênio em sua formulação, tiveram impacto positivo no desenvolvimento de colônias de *Bradyrhizobium* spp. (maior nodulação). As diferenças significativas no número de nódulos por planta obtidos no experimento corroboram com os valores observados por Othman et al. (1991) e Okeleye e Okelana (1997).

Tabela 8 - Efeito de diversos tratamentos de semente sobre o número de nódulos de *Bradyrhizobium* spp. por planta (NNB) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	NNB	
		30 DAS	50 DAS
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	33,4b	42,1b
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	54,2a	67,4a
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	31,5b	43,2b
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	29,6b	49,5b
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	63,2a	78,5a
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	27,5b	39,5b
7	Composto 3 + Inoculante	26,4b	40,6b
8	Composto 1 + Inoculante	54,9a	67,8a
9	Composto 2 + Inoculante	29,8b	37,6b
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	58,6a	64,6a
11	Composto 3	29,1b	39,8b
12	Composto 1	51,4a	65,4a
13	Composto 2	26,8b	41,2b
14	CoMo + Inoculante	60,6a	75,4a
15	Inoculante	50,3a	68,6a
16	Testemunha	19,5c	40,2b
Coeficiente de variação		21,56%	23,56%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Avaliando a variável comprimento de raízes, verificou-se que aos 20 dias após a semeadura, a testemunha apresentou 7,52 cm de raízes em média, enquanto que nos demais tratamentos o comprimento variou de 10,21 a 20,44 cm, demonstrando que a testemunha foi estatisticamente inferior aos demais tratamentos (Tabela 9). Ainda na Tabela 9, nota-se que, aos 20 dias após a semeadura, os tratamentos que apresentaram cobalto e molibdênio (Co e Mo) se destacaram em relação aos demais, exceto quando comparado aos tratamentos 11 e 12.

As diferenças entre os tratamentos se mantiveram significativas aos 40 e 60 dias após a semeadura, para os tratamentos que utilizaram Co e Mo (Tabela 10). Entretanto, verificou-se que

os tratamentos 2, 4, 5 (com uso de fungicidas) e 8 (composto 1 + inoculante) proporcionaram incremento no crescimento de raízes, aos 20 dias após a semeadura, em relação aos demais tratamentos. Esse aumento fez com que esses tratamentos se igualassem em altura aos tratamentos com Co e Mo (Tabela 11).

Quanto à variável massa de matéria seca de raiz (Tabela 10), os resultados foram semelhantes aos observados para o comprimento de raiz. De modo geral, os tratamentos que apresentaram cobalto e molibdênio foram superiores em relação aos demais, aos 25 e 60 dias após a semeadura (Tabela 10); porém, não diferiram dos tratamentos 3, 6, 8, 9 e 11, aos 25 dias após a semeadura.

Provavelmente, o cobalto e o molibdênio auxiliaram na atividade da nitrogenase, uma vez que esses atuam diretamente na atividade dessa enzima. O cobalto faz parte da vitamina B<sub>12</sub>, precursora da leghemoglobina responsável pelo transporte de O<sub>2</sub> no bacterióide, enquanto que o molibdênio faz parte da nitrogenase auxiliando na quebra da tripla ligação do N<sub>2</sub> para formar o NH<sub>3</sub> (HENNING, 1996; HENNING et al., 2003; TAÍZ; ZEIGER, 2004). Esse fator provavelmente proporcionou maior crescimento radicular devido a maior *status* nutricional da planta.

O incremento na massa de matéria seca das raízes demonstra que a aplicação dos fertilizantes via tratamento de sementes permitiu maior desenvolvimento inicial do sistema radicular, principalmente em condições de deficiência hídrica, como ocorreu durante o período experimental.

Tabela 9 - Efeito do tratamento de semente sobre o comprimento de raízes (Cs, cm) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	Cs		
		20 DAS	30 DAS	40 DAS
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	14,5b <sup>1</sup>	19,6b	24,7b
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	13,6c	20,8ab	31,4ab
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	13,1c	18,5b	33,2a
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	13,2c	18,4b	31,5ab
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	12,3c	21,3ab	37,2a
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	14,5b	18,9b	26,5b
7	Composto 3 + Inoculante	15,7b	20,5ab	25,9b
8	Composto 1 + Inoculante	17,4a	24,5a	38,5a
9	Composto 2 + Inoculante	16,1ab	21,7ab	30,9ab
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	18,5a	23,8a	29,4ab
11	Composto 3	17,8a	22,1ab	28,8ab
12	Composto 1	17,5a	25,2a	35,7a
13	Composto 2	15,3b	21,7ab	27,5b
14	CoMo + Inoculante	18,4a	25,7a	37,3a
15	Inoculante	10,3d	19,2b	28,7ab
16	Testemunha	6,9e	14,6c	20,6c
Coeficiente de variação		14,65%	16,43%	11,32%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.



Tabela 10 - Efeito do tratamento de semente sobre a massa seca de raiz (MSr, g.planta<sup>-1</sup>) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	MSr		
		25 DAS	40 DAS	60 DAS
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	3,40d <sup>1</sup>	27,12cd	37,74b
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	7,98a	38,16a	39,11b
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	5,66bc	24,54cd	39,03b
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	5,09cd	28,53c	31,85c
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	5,92b	36,03ab	37,4b
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	6,54ab	27,85cd	30,06d
7	Composto 3 + Inoculante	5,76bc	23,98d	37,1b
8	Composto 1 + Inoculante	6,15ab	35,2ab	36,02b
9	Composto 2 + Inoculante	6,10ab	27,04cd	36,49b
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	7,90a	29,02bc	48,11a
11	Composto 3	6,7ab	31,55b	37,95b
12	Composto 1	7,69a	36,81a	39,08b
13	Composto 2	5,06cd	29,27bc	39,93b
14	CoMo + Inoculante	6,77ab	32,51b	48,58a
15	Inoculante	3,18d	16,44e	25,92e
16	Testemunha	1,87e	10,58f	20,75e
Coeficiente de variação		21,1%	8,563%	7,23%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Quando é analisado a variável estatura de plantas, constata-se que em média, as plantas da testemunha apresentavam 10,3 cm de altura aos 25 dias após a semeadura, enquanto que, as plantas submetidas ao tratamento somente com inoculante (150 mL por 100 kg de sementes) apresentaram 13,7 cm de altura, e as plantas dos demais tratamentos entre 19,2 e 27,6 cm. Os tratamentos constituídos pelo composto 1 + thiram + carbendazim + inoculante (150 + 140 + 60 + 150 mL por 100 kg de sementes), composto 2 + thiram + carbendazim + inoculante (150 + 140 + 60 + 150 mL por 100 kg de sementes), composto 1 + thiram + carbendazim (150 + 140 + 60 mL por 100 kg de sementes), composto 2 + thiram + carbendazim (150 + 140 + 60 mL por 100 kg de sementes) e composto 1 (150 mL por 100 kg de sementes) proporcionaram a maior

altura de plantas aos 20 dias após a semeadura, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Diferenças significativas na altura de plantas ainda foram encontradas nas avaliações posteriores, 30 e 40 dias após a semeadura (Tabela 11).

Quanto ao parâmetro massa seca da parte aérea (Tabela 12), em todas as avaliações realizadas, os tratamentos com composto 1, composto 2 e composto 3 aumentaram significativamente a massa das raízes, exceção feita na avaliação dos 25 dias após a semeadura entre os tratamentos inoculante e testemunha sem tratamento (Tabela 12). O tratamento com Co e Mo (tratamento 12) foi superior aos demais 60 dias após a semeadura, comprovando o efeito verificado nos tratamentos anteriores para as variáveis comprimento de raiz (Tabela 9) e número de nódulos de *Bradyrhizobium* spp. por planta (NNB) (Tabela 8).

O aumento no crescimento da parte aérea é provavelmente consequência do maior desenvolvimento do sistema radicular, o que proporcionou acréscimo na absorção de água e de nutrientes do solo, potencializando o crescimento da parte aérea, uma vez que existe uma alometria de crescimento entre esses (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Tabela 11 - Efeito do tratamento de semente sobre o altura (H, cm) da parte aérea de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	H		
		20 DAS	30 DAS	40 DAS
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	23,4b <sup>1</sup>	40,2b	49,4ab
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	25,2ab	45,5a	55,6a
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	22,6b	40,5b	50,2ab
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	25,2ab	38,7b	48,6b
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	29,7a	47,4a	58,6a
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	26,7ab	39,4b	48,7b
7	Composto 3 + Inoculante	28,5a	41,3b	52,1a
8	Composto 1 + Inoculante	30,3a	46,3a	57,4a
9	Composto 2 + Inoculante	24,3b	42,1b	51,7a
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	29,4a	47,2a	57,9a
11	Composto 3	23,5b	41,6b	50,4a
12	Composto 1	28,6a	48,2a	59,1a
13	Composto 2	23,7b	43,2ab	49,6ab
14	CoMo + Inoculante	29,4a	47,9a	58,3a
15	Inoculante	21,7b	38,7b	47,2ab
16	Testemunha	14,5c	29,3c	40,1b
Coeficiente de variação		11,22%	14,67%	12,78%

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 12 - Efeito do tratamento de semente sobre a massa de matéria seca da parte aérea (MSpa, g.planta<sup>-1</sup>) de soja, variedade cultivada FT-Abyara, em diferentes dias após a semeadura (DAS). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	MSpa		
		25 DAS	40 DAS	60 DAS
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	15,1de <sup>1</sup>	120,1cd	206,7d
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	20,4a	158,4a	250,8b
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	16,1d	105,2e	196,8d
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	16,7cd	112,2de	161,6f
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	17,1bc	111,6de	248,7b
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	17,8b	105,2e	160,1f
7	Composto 3 + Inoculante	15,4de	121,6c	161,2f
8	Composto 1 + Inoculante	21,3a	134,3b	239,5b
9	Composto 2 + Inoculante	15,5de	97,9ef	179,2e
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	18,1b	119,5cd	244,8b
11	Composto 3	20,5a	160,1a	227,8c
12	Composto 1	12,4hi	115,5d	229,8c
13	Composto 2	14,7f	135,7b	246,7b
14	CoMo + Inoculante	14,4fg	124,1c	257,6a
15	Inoculante	10,2ij	107,6de	164,8f
16	Testemunha	8,35j	87,4f	139,9g
Coeficiente de variação		19,39	10,44	5,13

<sup>1</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

A produtividade de grãos de soja foi positivamente influenciada pelos tratamentos com os compostos fertilizantes avaliados. Porém, o tratamento que proporcionou a maior produtividade de grãos foi o composto 2 + thiram + carbendazim + inoculante (150 + 140 + 60 + 150 mL por 100 kg de sementes), 2.612 kg.ha<sup>-1</sup>, não diferindo dos tratamentos de 3 a 14, enquanto que a testemunha produziu 2.039 kg.ha<sup>-1</sup>, uma amplitude de 21,9% de superioridade de grãos obtida quando comparado à testemunha sem tratamento nenhum (Tabela 13).

Esse resultado está diretamente vinculado à composição do composto 2, que possui em sua formulação cobalto e molibdênio. Verifica-se nos ensaios realizados em campo e em

laboratório que esse composto foi o que influenciou significativamente a maior nodulação das plantas de soja (maior quantidade de células viáveis por semente), incrementou massa de matéria seca da parte aérea e de raiz, resultando em maior produtividade de grãos quando comparado à testemunha sem tratamento com fertilizantes, apenas com o inoculante, ou em relação aos demais compostos avaliados.

Entretanto, em outros trabalhos foram obtidos aumentos significativos na produtividade de soja ao molibdênio aplicado (VOSS; PÖTTKER, 2001). Há evidências de respostas positivas da aplicação de cobalto na fixação biológica do  $N_2$  e na produtividade de soja quando a planta está bem suprida de molibdênio (CAMPO; HUNGRIA, 2002), mas os trabalhos da literatura não têm demonstrado que isso seja verdadeiro (CAMPO; LANTMANN, 1998; SFREDO et al., 1997).

Tabela 13 - Efeito do tratamento de semente sobre a produtividade de grãos (P, kg.ha<sup>-1</sup>) de soja, variedade cultivada FT-Abyara. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Safra 2007/2008

Id	Tratamento	P
1	Composto 3 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	2101 bc
2	Composto 1 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	2612 a
3	Composto 2 + Thiram + Carbendazim + Inoculante	2204 abc
4	Composto 3 + Thiram + Carbendazim	2099 bc
5	Composto 1 + Thiram + Carbendazim	2475 abc
6	Composto 2 + Thiram + Carbendazim	2310 abc
7	Composto 3 + Inoculante	2349 abc
8	Composto 1 + Inoculante	2527 ab
9	Composto 2 + Inoculante	2297 abc
10	Thiram + Carbendazim + CoMo + Inoculante	2495 ab
11	Composto 3	2214 abc
12	Composto 1	2517 ab
13	Composto 2	2315 abc
14	CoMo + Inoculante	2487 ab
15	Inoculante	2149 bc
16	Testemunha	2039 c
Coeficiente de variação		7,49%

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

### 4.3 Considerações finais

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, nas condições em que foram conduzidos os experimentos com a cultura de soja, pode-se fazer as seguintes considerações finais: (i) todos os tratamentos diminuíram número de células de *Bradyrhizobium* spp. por unidade de volume (mL) de inoculante e, por conseqüência, por semente; (ii) os fungicidas thiram, carboxina (carboxin + thiram) e a mistura de thiram com carbendazim diminuíram o número de células de *Bradyrhizobium* spp. por unidade de volume (mL) de inoculante e por semente; (iii) o composto 2, na dose de 150 mL por 100 kg de sementes, foi o único tratamento que proporcionou aumento na quantidade de células de *Bradyrhizobium* spp. por semente dentro dos parâmetros das Recomendações Técnicas (acima de 300.000 células) para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Isso se deve ao fato de conter cobalto e molibdênio na sua composição; (iv) o maior número de nódulos de *Bradyrhizobium* spp. por planta foi obtido com os tratamentos composto 2 (150 mL por 100 kg de sementes), CoMo + inoculante (150 + 150 mL por 100 kg de sementes), e thiram + carbendazim + CoMo + inoculante (140 + 60 + 150 + 150); (v) todos os tratamentos com fertilizantes aplicados via semente aumentaram significativamente a altura de planta, o comprimento da raiz, a massa de matéria seca da parte aérea e a massa de matéria seca do sistema radicular quando comparados à testemunha ou ao tratamento apenas com inoculante; e (vi) o tratamento que proporcionou a maior produtividade de grãos ( $2.612 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , 21,9% superior à testemunha) foi o composto 2 + thiram + carbendazim + inoculante (150 + 140 + 60 + 150 mL por 100 kg de sementes), devido à composição do produto que contém cobalto e molibdênio na formulação, influenciando positivamente na nodulação.

## 5 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos neste trabalho com a cultura de soja, pode-se concluir que: (i) o tratamento de sementes de soja com fungicidas diminui o número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp.; (ii) a utilização de cobalto e molibdênio no tratamento de sementes de soja proporciona aumento na quantidade de células de *Bradyrhizobium* spp.; e (iii) o melhor parâmetro para avaliar a eficiência da inoculação no tratamento de sementes de soja é o número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp.



## REFERÊNCIAS

- ALBINO, U.B.; CAMPO, R.J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.527-534, 2001.
- ALMEIDA, A.M.R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; TORRES, E.; FARIAS, J.R.B.; BENATO, L.C.; PINTO, M.C.; VALENTIN, N. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.131-135, 2003.
- AMARA, A.M.; NASR, S.A. Impact of foliar application with biofertilizers and micronutrients on the growth and yield of *Bradyrhizobium* inoculated soybean plants. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v.40, n.2, p.567-578, 1995.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, P.R.; VALADARES, J.M.A.S. O molibdênio em solos do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., 1975, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1976. p.107-111.
- BIKROL, A.; SAXENA, N.; SINGH, K. Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.4, n.7, p.667-671, 2005.
- BIZARRO, M.J.; ROESCH, L.F.W.; SELBACH, P.A.; CAMARGO, F.A. Avaliação de resposta à inoculação de soja em solo submetido a diferentes sistemas de manejo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina, 2001.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.25, p.407-415, 1997.
- BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1987. 61p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 21).
- BORTELS, H. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.1, p.333-342, 1930.
- BROCH, D.L.; FERNANDES, C.H. **Resposta da soja à aplicação de micronutrientes**. Maracaju: Fundação, 1999. 56p. (Informativo Técnico 2/99).
- BRONDANI, D.; DORNELLES, S.H.B.; SANCHOTENE, D.M.; HATSCHBACH, M.; DEBORTOLI, M.P. Dessecação de plantas daninhas em pré-colheita da cultura da soja com a utilização de herbicidas. In: REUNIÃO E PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 31., 2003, Porto Alegre. Dessecação de plantas daninhas em pré-colheita da cultura da soja com a utilização de herbicidas, 2003.
- BUENO, C.J.; MEYER, M.C.; SOUZA, N.L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.25, n.1, p.231-235, 2003.

- BULEN, W.A.; LeCONTE, J.R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirements for N<sub>2</sub> reduction, ATP-dependent H<sub>2</sub> evolution, and ATP hydrolysis. **National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings**, Washington, v.56, p.979-986, 1966.
- CALDWELL, B.E. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison: ASA, 1973. 681p. (ASA. Agronomy, 16).
- CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-SOJA), 2000. 32p. (Circular Técnica, 26).
- CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Importância dos micronutrientes na fixação biológica do N<sub>2</sub>. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n.98, p.6-9, 2002.
- CAMPO, R.J.; LANTMANN, A.F. Efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.8, p.1245-1253, 1998.
- CAMPOS, B.H.C. Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.423-426, 1999.
- CAMPOS, B.H.C.; GNATTA, V. Inoculantes e fertilizantes foliares na soja em área de populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.69-76, 2006.
- CAMPOS, B.H.C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, p.583-592, 2001.
- CARDENAS, L.; DOMINGUEZ, J.; QUINTO, C.; LOPEZ-LARA, I.M.; LUGTENBERG, B.J.J.; SPAINK, H.P.; RADEMAKER, G.J.; HAVERKAMP, J.; THOMAS-OATES, J.E. Isolation, chemical structure and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.29, p.453-464, 1995.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S.A. Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M. C.P. (Ed.). **Microbiologia dos Solos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.41-58.
- CONAB [Online]. Companhia Nacional de Abastecimento. Homepage: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3levsaf.pdf>. 2006.
- CONAB. Indicadores da agropecuária. Brasília, 2008. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> > Acesso em: 19 out. 2008.
- DALL'AGNOL, A. The impact of soybeans on the Brazilian economy. **AGJacto**, Pompéia, n.2, p.16-17, 2000.
- DENISON, R.F.; HARTER, B.L. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. Nodule oximetry and computer modelling. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.1355-1364, 1995.

DEPOLLI, H.; FRANCO, A.A. **Inoculação de sementes de leguminosas**. Seropédica: EMBRAPA-UAPNPBS, 2000. 31p. (Circular Técnica 1/2000).

DOMIT, L.A.; COSTA, J.A.; VIDOR, C.; PEREIRA, J.S. Inoculação de sementes de cereais de estação fria com *Bradyrhizobium japonicum* e seu efeito na soja cultivada em sucessão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.313-320, 1990.

DORNELLES, S.H.B.; SANCHOTENE, D.M.; NOAL, A.A.; MEZZOMO, R.F.; BORTOLOTTI, R.P. **Influência do tratamento de sementes com micronutrientes e fungicidas sobre sobrevivência de bactérias do grupo rizóbio inoculadas em sementes de soja**. Santa Maria: UFSM, 2006. (Boletins Técnicos publicados por instituição de ensino, pesquisa e extensão).

DOURADO NETO, D.; TERUEL, D.A.; REICHARDT, K.; NIELSEN, D.R.; FRIZZONE, J.A.; BACCHI, O.O.S. Principles of crop modeling and simulation: III. Modeling of root growth and other belowground processes, limitations of the models, and the future of modeling in agriculture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.especial, p.58-61, 1998.

ELLIS, S. Soybeans: A flash in the pan, or here for the long haul?  
<http://www.farms.com/FarmsPages/ExpertsBio/tabid/293/Default.aspx?NewsID=20213&authorid=43>. Acesso em 11 jun. 2009.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja - região central do Brasil - 2009/2010**. Londrina: EMBRAPA Soja. 2008. 262p. (EMBRAPA Soja, Documentos, 13).

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1981. 12p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual, 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. 496p.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, n.2, p.771-778, 1990.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *S. typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.16, p.5129-5135, 1991.

FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A.A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 22p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 10).

FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da; HENNING, A.A. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão caupi**: avanços tecnológicos. Brasília-DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

- GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Habituation to normally lethal acidity by prior growth *Escherichia coli* at a sub lethal acid pH value. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, n.1, p.77-79, 1989a.
- GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Resistance of acid-habituation *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, n.6, p.211-214, 1989b.
- GUPTA, U.C.; LIPSETT, J. Molybdenum in soil, plants, and animals. **Advances in Agronomy**, Madison, v.34, p.73-115, 1981.
- HASHEM, F.M.; SALEH, S.A.; VAN BERKUM, P.; VOLL, M. Survival of *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) on fungicide-treated peanut seed in relationship to plant growth and yield. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.13, p.335-340, 1997.
- HEGAZY, M.H.; EL HAWARY, F.I.; GHOBRIAL, W.N. Effect of micronutrients application and *Bradyrhizobium japonicum* inoculation on soybean. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v.1, p.381-398, 1990.
- HENNING, A.A. Patologia de sementes. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 43p. (EMBRAPA-CNPSO, Documentos, 90).
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKY, F.C.; COSTA, N.P. Avaliação de corantes, polímeros, pigmentos e fungicidas para o tratamento de sementes de soja. Londrina, **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p.234, 2003.
- HOWIESON, J.G.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. **Australian Journal Plant Physiology**, Murdoch, v.19, n.3, p.287-296, 1992.
- HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542p.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability on nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, n.31, p.45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture: forestry ecology and environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. p.25-42.
- IKUTA, N. **Desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum***. 1995. 90p. Tese (Doutorado na área de Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.
- JOHANNES, E.; GUNARTO, L. Nodulation and uptake of nitrogen and phosphorus by soybean inoculated with four strains of *Bradyrhizobium japonicum* and applied with phosphorus, molybdenum and copper. **Philippine Agriculturist**, Laguna, v.70, p.193-201, 1987.

- LAL, S. Effect of pesticides on Rhizobium-legume symbioses. In: LAL, R.; LAL, S. (Ed.) **Pesticides and nitrogen cycle**. Boca Raton: CRC press, 1988, v.3. p.47-128.
- LIMA, S.C.; LOPES, E.S.; LEMOS, E.G.M. Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum*) e produtividade da soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.360-366, 1998.
- MARTENS, D.C.; WESTERMANN, D.T. Fertilizers applications for correcting micronutrient deficiencies. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SHUMAN, L.M.; WELCH, R.M. (Ed.). 2<sup>nd</sup> ed. **Fertilizers applications for correcting micronutrient deficiencies: micronutrients in agriculture**. Madison: **Soil Science Society of America**, 1991. p.549-592.
- MIGUEL, D.L.; MOREIRA, F.M.S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, n.4, p.873-883, 2001.
- MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosas introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 160p. Tese (Doutorado em Solos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.
- O'HARA, G.W.; GLENN, A.R. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, New York, v.161, n.4, p.286-292, 1989.
- OKELEYE, K.A.; OKELANA, M.A. Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.67, p.10-12, 1997.
- ORGAMBIDE, G.G.; LEE, J.I.; HOLLINGSWORTH, R.I.; DAZZO, F.B. Structurally diverse chitolipooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in membranes of wild-type *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Biochemistry**, Washington, v.34, p.3832-3840, 1995.
- OTHMAN, W.M.W.; LIE, T.A.; MANNETJE, L.; WASSINK, G.Y.; WAN-OTHMAN, W.M. Low level phosphorus supply affecting nodulation, N<sub>2</sub> fixation and growth cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, Crawley, v.15, p.67-74, 1991.
- PEREIRA, C.E. **Pelculização e tratamento fungicida de sementes de soja: efeitos no armazenamento e na inoculação com *Bradyrhizobium***. 2005. 115p. Dissertação (Mestrado na área de Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Estabelecimento de *B. japonicum* num solo de cerrado pela inoculação de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.13, p.35-39, 1989.
- POUPOT, R.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PROMÉ, J.C. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or non-sulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosamine terminus. **Biochemistry**, Washington, v.32, p.10430-10435, 1993.

PROVANCE, P. World Agricultural Production - May 2009.

<http://www.thebioenergysite.com/articles/349/world-agricultural-production-may-2009>. Acesso em: 11 jun. 2009.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 27., 1999, Chapecó. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Rio grande do Sul e em Santa Catarina 1999/2000**. Chapecó, SC. Epagri/CPMP, 1999. 167p.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 28., 2000: Santa Maria. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Rio grande do Sul e em Santa Catarina 2000/2001**. Santa Maria, RS. UFSM/CCR/Departamento de Defesa Fitossanitária, 2000. 160p.

RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; FRANCO, A.A.; LOPES, E.S. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em Latossolo ácido. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, Campinas, v.11, n.2, p.275-282, 1987.

RUSCHEL, A.P.; ROCHA, A.C.M.; PENTEADO, A.F. Efeito do boro e do molibdênio aplicados a diferentes revestimentos de semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.5, n.3, p.49-52, 1970.

SANCHOTENE, D.M.; NOAL, A.A.; MEZZOMO, R.F.; BORTOLOTTI, R.P. **Eficiência de fertilizantes aplicados em tratamento de sementes e sua interação com fungicidas e inoculantes na cultura da soja**. 2006. (Boletins Técnicos publicados por instituição de ensino, pesquisa e extensão).

SFREDO, G.J.; BORKERT, C.M.; NEPOMUCENO, A.L.; OLIVEIRA, M.C.N. Eficácia de produtos contendo micronutrientes, aplicados via semente, sobre produtividade e teores de proteína da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.21, p.41-45, 1997.

SPAINK, H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.345-368, 1995.

STACEY, G.L.S.; SANJUAN, J.; BANFALVI, Z.; NIEUWKOOP, A.J.; CHUN, J.Y.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. NodZ, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipopolysaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p. 620-633, 1994.

STEPHENS, B.D.; NEYRA C.A. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, p.731-735, 1983.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artemed, 2004. 719p.

TEMPRANO, F.J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO, M.; DAZA, A.; SANTAMARIA, C.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N. Survival of several *Rhizobium-Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seed. **International Microbiology**, Barcelona, v.5, p.81-86, 2002.

TONG, Z.; SADOWSKY, M.J. A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.581-586, 1994.

URQUIAGA, S.; BODDEY R.M.; NEVES, M.C.P. A necessidade de uma revolução mais verde. In: FERTIBIO 1999 INTERRELAÇÃO, 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999.

USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates - March 2009.  
<http://www.thebioenergysite.com/articles/283/world-agricultural-supply-and-demand-estimates-march-2009>. Acesso em: 11 jun 2009.

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

VOSS, M.; PÖTTKER, D. Adubação com molibdênio em soja, na presença ou ausência de calcário aplicado na superfície do solo, em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.787-791, 2001.

YANNI, Y.G. Response of symbiotic interrelationship between soybean and the indigenous or inoculated microsymbiont, *Bradyrhizobium japonicum*, to soil application of manganese and molybdenum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.6, p.289-294, 1990.

YUSUF, R.I.; SIEMENS, J.C.; BULLOCK, D.G. Growth analysis of soybean under no-tillage and conventional tillage systems. **Agronomy Journal**, Madison, v.91, p.928-933, 1999.

ZUBERER, D.A. Recovery and enumeration of viable Bacteria. In: WEAVER WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Microbiological and Biochemical Properties**. Madison: SSSA, 1994. 1121p. pt 2: Methods of soil analysis.