

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FERNANDA BRUNETTA GODINHO ANGHINONI

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PRÉ-INOCULAÇÃO COM  
*Bradyrhizobium* spp. EM SEMENTES DE SOJA TRATADAS  
INDUSTRIALMENTE**

Maringá

2016

FERNANDA BRUNETTA GODINHO ANGHINONI

Avaliação da eficiência da pré-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em sementes de soja tratadas industrialmente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini

Maringá

2016

## FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA BRUNETTA GODINHO ANGHINONI

Avaliação da eficiência da pré-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em sementes de soja tratadas industrialmente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

---

Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Junior  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em:  
Local de defesa:

## DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, aos meus pais, Edi e Odenilson (*In memorian*), ao meu marido, ao meu irmão e sobrinha, aos meus familiares, aos meus amigos e aos meus professores.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida, que me concedeu mais essa conquista e por sempre me abençoar e guiar meus caminhos. Por não me deixar desmotivar e estar ao meu lado em todos os momentos, me ajudando a superar cada obstáculo dos estudos e trabalhos.

Aos meus pais Edi e Odenilson (*In Memoriam*) que sempre me apoiaram, estiveram ao meu lado em todos os momentos, por acreditarem em mim e me apoiarem. Ao meu pai Odenilson (*in memorian*) que foi o grande exemplo de vida e determinante na escolhe de seguir esta carreira, me deixando seus valores, princípios e disciplina para alcançar meus objetivos. A minha mãe que com todas suas preocupações sempre estava perto para me apoiar e incentivar a ir cada vez mais longe. Um exemplo de garra, coragem, força e determinação que levei neste período e vou levar sempre comigo.

Ao meu marido Guilherme pelo seu carinho, amor, compreensão e motivação. Pela sua dedicação em me ajudar e ensinar, mesmo nas situações que ele mesmo desconhecia.

Ao meu irmão, Fernando, minha sobrinha, Sophia, as minhas cunhadas, Gabriela e Arielle e aos meus sogros Dulce e Valmor, pelo incentivo, amizade e carinho.

A todos os meus familiares, pelo incentivo, em especial a minha avó, Assunta, os quais foram e são os meus maiores exemplos.

Ao meu orientador, professor Dr. Alessandro Lucca Braccini, pela orientação, pelo apoio e pelas oportunidades a mim concedidas.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Scapim, pelo conhecimento compartilhado e sugestões.

A todos os professores, funcionários e acadêmicos do Programa de Pós-graduação em Agronomia que contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha companheira e amiga de pesquisa e estudos, Glaucia, pela ajuda, parceria, dedicação e amizade.

Aos colegas de trabalho do Nupagri e PGA, em especial, Érika Sato e Reinaldo, pela colaboração.

A Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelos cinco anos de graduação e dois anos de pós-graduação realizados nesta instituição.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da UEM, pela oportunidade de realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

## **BIOGRAFIA**

FERNANDA BRUNETTA GODINHO, filha de Odenilson de Assis Godinho e Edi Lourdes Brunetta Godinho, nascida em 29 de maio de 1990.

Concluindo o Ensino Médio em dezembro de 2007, no Colégio Mãe da Divina Providência, em Primavera do Leste - MT.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá, Campus Sede, em 24 de janeiro de 2014.

Em março de 2015, matriculou-se no curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá.

## Avaliação da eficiência da pré-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em sementes de soja tratadas industrialmente

### RESUMO

O N (N) é um nutriente essencial e de grande demanda para cultura da soja. A principal forma da planta obter o N é por meio da fixação biológica de N, que além de substituir a adubação nitrogenada tem a capacidade de suprir toda a demanda do nutriente requerida pela cultura da soja. A pré-inoculação, que consiste em inocular a bactéria fixadora de N nas sementes com maior antecedência a semeadura constitui uma prática já utilizada em outros países. Porém, a utilização dessa técnica depende especialmente da habilidade da bactéria em sobreviver nas sementes, do tipo de tratamento realizado no beneficiamento e das condições de armazenamento das sementes. Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da pré-inoculação com *Bradyrhizobium* spp., comparado com a inoculação padrão, em sementes de soja tratadas industrialmente, em dois anos consecutivos, na nodulação das plantas, nos teores de N e nos componentes de rendimento da cultura. O experimento foi instalado nos anos agrícolas de 2013/14 e 2014/15 na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 10 tratamentos e quatro repetições. Foram testadas combinações de diferentes inseticidas e fungicidas em tratamento de sementes industrial, inoculação padrão das sementes, inoculação com inoculante LT e diferentes períodos de pré-inoculação (0, 5 e 10 dias), bem como um tratamento com adubação nitrogenada e uma testemunha. No campo e em laboratório foram realizadas as seguintes determinações: número e massa de nódulos no início do florescimento, massa seca da parte aérea, teor de N na parte aérea e na semente, número de vagens por planta, massa de mil sementes e produtividade. Os resultados obtidos permitem concluir que quando as sementes são inoculadas com o inoculante LT e os produtos carbendazim e thiram + imidacloprido e tiodicarbe, estas podem ser inoculadas e armazenadas por até 10 dias, sem ocorrer redução nos componentes de produtividade da soja avaliados. A utilização da adubação nitrogenada convencional compromete a massa de mil sementes e o teor de N na semente, sem, contudo, afetar a produtividade da cultura, quando comparado aos tratamentos de inoculação e pré-inoculação.

**Palavras-chave:** tratamento industrial de sementes, pré-inoculação, nodulação, produtividade.

## Evaluation of *Bradyrhizobium* spp. pre-inoculation efficiency in soybean seeds industrially treated

### ABSTRACT

Nitrogen (N) is an essential nutrient, greatly demanded by the soybean crop. Currently, the main way for the plant to supply N demand is through biological nitrogen fixation, which in addition to the replacement of the nitrogen chemical fertilization, also has the capacity to supply all the nutrient demand required for the soybean crop. The pre-inoculation consists in the inoculation of nitrogen fixing bacteria on the seeds prior to sowing, which is a practice that has been used in many other countries. However, the use of this technique depends especially on bacteria's ability to survive while inoculated, on the type of treatment used in seeds processing and on its storage conditions. Thus, this study aims to evaluate the effect of pre-inoculation compared to the standard inoculation in soybean seeds industrially treated, for two consecutive years, on the plants nodulation, on N content and on crop yield components. The experiment was conducted in the agricultural years of 2013/14 and 2014/15 in the Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), of the Universidade Estadual de Maringá (UEM). The experimental design consisted in a randomized block, with 10 treatments and four replications. Different combinations of insecticides and fungicides for industrial seed treatment, standard seed inoculation, inoculation with LT inoculant at different periods of pre-inoculation (0, 5 and 10 days), as well as a treatment with nitrogen fertilization and an absolute control treatment. At field and laboratory the following determinations were carried out: number and mass of nodules at flowering, dry matter of shoots and roots, nitrogen content in shoots and grains, number of pods per plant and mass of a thousand seeds. The results showed that the use of LT inoculant along with the carbendazim and thiram in addition to imidacloprid and thiodicarb provide plants with greater dry mass of shoots. Results showed that seeds can be inoculated with LT inoculant and stored for up to 10 days, without decreasing the yield components of soybean. The use of conventional nitrogen fertilization is not recommended as it may compromise the weight of a thousand seeds and the nitrogen content in the seeds, without affecting crop productivity.

**Keywords:** industrial seed treatment, pre-inoculation, nodulation, yield.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Tratamento químico e industrial de sementes.....</i>	16
2.2 <i>Fungicidas e inseticidas no tratamento de sementes.....</i>	17
2.3 <i>Adubação nitrogenada e inoculação das sementes.....</i>	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 <i>Instalação e condução do experimento .....</i>	23
3.2 <i>Características avaliadas .....</i>	27
3.3 <i>Número mais provável (NMP) de Bradyrhizobium spp. e bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental .....</i>	28
3.4 <i>Delineamento experimental e análise estatística .....</i>	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1 <i>Resultados da análise de variância .....</i>	30
4.2 <i>Resultados da análise por contrastes ortogonais.....</i>	32
4.3 <i>Considerações finais.....</i>	43
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultado da análise química e física do solo da área experimental, antes da implantação da cultura (Maringá/PR, UEM – 2013/2014).....23
- Tabela 2.** Tratamentos com aplicação dos inoculantes padrão líquido (L) e inoculante LT em sementes de soja, aos 0, 5 e 10 dias antes da semeadura da cultura, além da testemunha e tratamento com adubação nitrogenada (Maringá – PR, safras 2013/14 e 2014/15).....26
- Tabela 3.** Contrastes ortogonais para a comparação das médias dos tratamentos.....30
- Tabela 4.** Resumo da análise de variância, referente ao número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), teor de N na semente (TNS), número de vagens por planta (NVAG), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, com diferentes formulações, para a cultivar BMX Potência RR, no ano agrícola de 2013/2014. (UEM, Maringá – PR). ..... 31
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância, referente ao número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), teor de N na semente (TNS), número de vagens por planta (NVAG), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, com diferentes formulações, para a cultivar BMX Potência RR, no ano agrícola de 2014/2015. (UEM, Maringá – PR). ..... 31
- Tabela 6.** Resultados da análise dos contrastes ortogonais pelo teste F para massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de N na parte aérea (TNPA), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, no ano agrícola de 2013/2014. (UEM, Maringá – PR).....32
- Tabela 7.** Resultados dos contrastes ortogonais pelo teste F para massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de N na parte aérea (TNPA), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, no ano agrícola de 2014/2015. (UEM, Maringá – PR)..... 36
- Tabela 8.** Resultados da análise conjunta dos contrastes ortogonais pelo teste F para número de nódulos (NNOD), número de vagens por planta (NVAG), teor de N na semente (TNS),

massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, nos anos agrícolas 2013/14 e 2014/15.....40

**Tabela 9.** Resultados médios de número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), número de vagens por planta (NVAG), teor de N nas sementes (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade de grãos (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, para a cultivar BMX Potência RR (Maringá/PR, UEM – 2013/2014).....56

**Tabela 10.** Resultados médios de número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA)), número de vagens por planta (NVAG), teor de N nas sementes (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade de grãos (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, para a cultivar BMX Potência RR (Maringá/PR, UEM – 2014/2015).....57

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Dados climáticos, em decêndios, da precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas, entre outubro de 2013 e março de 2014, na Fazenda Experimental de Iguatemi (Maringá – PR, 2013/2014). Fonte: Laboratório de Análises de Sementes - FEI/UEM.....24

**Figura 2.** Dados climáticos, em decêndios, da precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas, entre outubro de 2014 e março de 2015, na Fazenda Experimental de Iguatemi (Maringá – PR, 2014/2015). Fonte: Laboratório de Análises de Sementes - FEI/UEM.....24

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou um dos crescimentos mais expressivos (HIRAKURI; LAZAROTTO, 2014) sendo que, atualmente, ocupa 49% da área de produção de grãos do país (MAPA, 2014). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2015), na safra 2013/2014, os EUA, Brasil e Argentina foram responsáveis por 81,40% de toda a produção mundial de grãos de soja, e a China, por 64,26% de todas as importações mundiais deste produto agrícola. Segundo o mesmo relatório, divulgado na safra 2014/2015, a produção mundial de soja foi 317,253 milhões de toneladas. O Brasil exportou 45,00 milhões de toneladas de grãos, enquanto que os Estados Unidos exportaram 45,59 milhões de toneladas, caracterizando-se como os maiores exportadores de soja do mundo. Adicionalmente, o mesmo relatório já previa que, juntos, Brasil e Estados Unidos seriam responsáveis por, aproximadamente, 80% das exportações mundiais na safra de 2015/2016. As exportações brasileiras estimadas para esta próxima safra, 2015/16, terão um aumento de 5,85% em relação à safra passada.

Das tecnologias que têm sido empregadas visando obter incrementos na produtividade da cultura, inclui-se o uso crescente de sementes de variedades melhoradas, associadas a aplicação, via sementes, de fungicidas, inseticidas e inoculantes, além de reguladores vegetais e polímeros. O interesse mundial na soja é, em grande parte, resultante do elevado teor de proteína de seus grãos, que pode chegar a 40%, constituindo uma importante fonte de alimentação tanto animal, quanto humana (CRISPINO et al., 2001).

O N é um nutriente que se destaca por participar da composição dos aminoácidos, proteínas, clorofila e muitas enzimas essenciais, que estimulam o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea das plantas e do sistema radicular. Atualmente, existe uma grande preocupação em relação à utilização desnecessária ou incorreta de adubos nitrogenados na cultura da soja, já que, além das perdas por volatilização e desnitrificação, ocorrem perdas de N por lixiviação, escoamento pela superfície do solo e por erosão, que resultam em acúmulo de nitrato nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos (LARA CABEZAS et al., 2000). Adicionalmente, pode-se citar como outro ponto negativo o elevado custo energético para a obtenção destes fertilizantes, que, quando utilizados de forma indevida, impactam fortemente nos custos de produção. Nesse sentido, tem sido estimulada a busca de alternativas que possibilitem reduzir o uso destes fertilizantes, não apenas para a soja, mas em outras culturas como milho e trigo.

No Brasil, de modo geral, o cultivo da soja é realizado sem uso de fertilizantes nitrogenados, uma vez que praticamente todo o N necessário ao metabolismo da planta é disponibilizado pelo processo de fixação biológica, realizada por bactérias diazotróficas associativas localizadas em nódulos radiculares, as quais utilizam como substrato, o N<sub>2</sub> atmosférico. O processo de fixação biológica do N (FBN) é essencial para que a produção da soja seja economicamente viável, pois a adubação nitrogenada custa aproximadamente 10 vezes mais. Hungria et al. (2001) relatam que, para produzir uma tonelada de grãos de soja, são necessários, aproximadamente, 80 kg de N ha<sup>-1</sup>. Esta demanda de N se distribui diferentemente nos diferentes órgãos da planta de soja, sendo que 65 kg de N ha<sup>-1</sup> são alocados nas sementes e 15 kg de N ha<sup>-1</sup> são alocados nas folhas, caule e raízes. Desse modo, considerando-se o rendimento médio nacional na produção de grãos de soja como 3.006 kg ha<sup>-1</sup> e o preço desses fertilizantes nitrogenados, tem-se uma economia estimada em US\$ 15 bilhões/safra (HUNGRIA et al., 2015).

Assim, a inoculação na cultura da soja é indispensável, pois é responsável por melhorar a produtividade da cultura e, como já dito, diminuir os custos de produção. Apesar dessa tecnologia ser aplicada na maioria das lavouras de soja do país, observa-se a sensibilidade dos rizóbios inoculados via semente aos efeitos dos agrotóxicos, resultando em um entrave na utilização desta tecnologia, já que o processo de inoculação deve ser realizado no momento ou pouco antes da semeadura. Esta operação é frequentemente descrita como uma atividade que reduz a eficiência da semeadura, em razão do tempo despendido para sua operação. Por vezes, essa dificuldade tem sido responsável pela não utilização da inoculação na cultura por parte dos agricultores (CAMPO; HUNGRIA, 2007).

A inoculação das sementes antes da comercialização, ou inoculadas com antecedência de alguns dias antes da semeadura (pré-inoculação), constituem práticas utilizadas há algumas décadas em outros países, para várias culturas, além da soja (DEAKER et al., 2004; HERRIDGE, 2008) e tem se constituído em estratégia que tende a difundir-se em lavouras de soja no país (EMBRAPA SOJA, 2013). No entanto, a aplicação dessa estratégia de inoculação depende de vários fatores, especialmente da habilidade da bactéria em sobreviver na semente, das condições de armazenamento das sementes e dos produtos adicionados a semente. Esses fatos tem restringido o uso dessa prática no Brasil (DATE, 2001). De acordo com Campo e Hungria (2007), avaliações realizadas em diversos experimentos no Brasil, durante quatro anos consecutivos, indicaram ser possível a inoculação antecipada das sementes da soja em até cinco dias antes da semeadura, o que possibilitaria ao produtor realizar a inoculação

previamente à semeadura e executá-la no momento mais oportuno. Todavia, a técnica da pré-inoculação das sementes de soja, associada à prática do tratamento industrial de sementes (TIS), comumente utilizado pelas indústrias sementeiras, tem sido pouco explorada e difundida na literatura especializada, tanto nacional como internacional.

Com a hipótese de que a inoculação antecipada das sementes de soja prejudica o processo de fixação biológica do N e o rendimento, em comparação com a inoculação convencional no momento da semeadura, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da pré-inoculação, comparado com a inoculação padrão, em sementes de soja tratadas industrialmente, em dois anos consecutivos, na nodulação das plantas, nos teores de N e nos componentes de rendimento da cultura.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Tratamento químico e industrial de sementes**

Atualmente, com a expansão do cultivo da soja e os altos rendimentos alcançados, fazem com que, algumas vezes, os produtores não utilizem dos cuidados fitossanitários corretos ocasionando aumento na incidência de patógenos nas áreas cultivadas. Conseqüentemente, há um aumento no número de princípios ativos recomendados para o manejo de pragas e doenças da cultura (HENNING et al., 1997).

O tratamento de sementes é usado, principalmente, com a finalidade de permitir a germinação de sementes infectadas, controlar patógenos transmitidos pela semente e protegê-las dos fungos do solo (HENNING et al., 1994). Além de conferir proteção às sementes, o tratamento oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura, com custos reduzidos, sendo que esta prática representa menos de 0,5% do custo de instalação da lavoura (HENNING, 2005).

O tratamento de sementes refere-se à aplicação de produtos químicos eficientes, com diferentes finalidades, a fim de preservar e melhorar emergência das sementes, permitindo que as culturas expressem todo seu potencial genético (MENTEN; MORAES, 2010). A prática inclui a aplicação de defensivos, como fungicidas e inseticidas, produtos biológicos, inoculantes, micronutrientes, bioestimulantes, entre outros, agregando efeitos resultantes da

atual tecnologia à semente (FOSSATI, 2004), com a finalidade de que apresentem a máxima capacidade germinativa e de emergência possíveis (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Além de oferecer proteção às sementes, o tratamento deve se estender para as plântulas a campo, mantendo o devido controle contra fungos e insetos. Os produtos devem ser compatíveis entre si, a fim de evitar prejuízos à qualidade fisiológica da semente por fitotoxicidade, ou até mesmo diminuir o espectro de ação esperado (MAGALHÃES, 2013).

Algumas empresas produtoras de sementes estão adotando o processo de tratamento de sementes antecipado ou tratamento industrial de sementes (TIS), antes do ensaque ou no momento da entrega das sementes ao produtor. Este tipo de tratamento vem ganhando espaço no mercado de sementes de soja. Segundo França Neto et al. (2015), cerca de 40% das sementes de soja utilizadas no Brasil são tratadas nesse sistema. Na safra 2013/14 a capacidade operacional média para o tratamento industrial de sementes foi de 176.000 sacas de soja de 40 kg. Na safra correspondente aos anos de 2014/15 este número subiu para 226.000 sacas, representando um aumento médio de 50.000 sacas. Este aumento está relacionado com a grande capacidade operacional das máquinas, que antes não eram utilizadas. As máquinas utilizadas para o tratamento de sementes industrial são capazes de tratar de 5 a 30 toneladas de sementes de soja por hora (FRANÇA NETO, 2015).

A crescente utilização do tratamento industrial de sementes pode estar relacionada com alguns benefícios aos produtores como: maior rendimento, economia de mão de obra e de tempo, menor risco de intoxicação ao operador, precisão de aplicação em relação à dose correta dos produtos, boa cobertura da semente com os produtos químicos e necessidade apenas da realização da inoculação das sementes. Todavia, podem ocorrer problemas fitotécnicos, quando se utiliza esta prática, sendo que alguns deles foram discutidos por Menten (1996), quanto à utilização de tratamento de sementes antecipado. Um deles está relacionado a um possível efeito fitotóxico, que pode ser acentuado, em decorrência do aumento do período de armazenamento das sementes tratadas.

## **2.2 Fungicidas e inseticidas no tratamento de sementes**

A utilização do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas é uma prática que, aproximadamente, 95% dos produtores de soja já adotam (HENNING et al., 2010). O tratamento de sementes como forma preventiva vem sendo utilizado para evitar possíveis perdas decorrentes das ações de pragas do solo, da parte aérea e para evitar a disseminação de

fitopatógenos em áreas isentas (SILVA, 1998). Essa prática está sendo cada vez mais adotada, pois confere à planta condições de defesa contra o ataque de doenças e pragas, possibilitando maior potencial para o desenvolvimento inicial da cultura e contribuindo para obtenção do estande inicial almejado (BAUDET; PESKE, 2007).

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos-praga e patógenos. Desde a implantação da cultura pode haver ação de pragas de solo como lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus*), cupim (*Procornitermes triacifer*), tamanduá da soja (*Sternechus subsignatus*) e piolho de cobra (*Julus* spp.) e fungos como *Phomopsis* sp., *Cercospora* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Corynespora cassiicola* que podem reduzir o estande, causando falhas na população de plantas da lavoura, por deteriorarem as sementes após a semeadura, danificarem as raízes após a germinação e parte aérea das plântulas após a emergência, pois, na fase inicial de desenvolvimento das plantas, estas são mais suscetíveis a danos e morte (HENNING, 1987; BAUDET; PESKE, 2007). Além disso, pragas como mosca-branca (*Bemisia tabaci*), brasileirinho (*Diabrotica speciosa*) e torrãozinho (*Aracanthus mourei*) podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento da cultura desde o início da emergência das plântulas (ZUCCHI, 1993).

O tratamento de lotes de sementes também trata as impurezas, como poeiras e fragmentos de plantas, que podem estar contaminados e que geralmente não são verificadas durante a análise fitossanitária dos lotes (DHINGRA, 2005).

Alguns inseticidas podem reduzir a qualidade fisiológica, como sumicidín em sementes de soja (SARASWATHI, 1996), thiodicarb e carbofuran em sementes de milho e trigo (GODOY, 1990; OLIVEIRA; CRUZ, 1986; KHALLEQ; KLANTT, 1986). Assim, também foi observado que alguns inseticidas não afetam a qualidade das sementes, a exemplo dos carbamatos sistêmicos carbofuran e thiodicarb em arroz e algodão (GODOY, 1990) e fenitrotion, malation, pirimifos-metil e deltametrin em sementes de soja (PINTO, 1991).

Quanto ao efeito do tratamento de sementes com inseticidas e fungicidas sobre a inoculação das sementes com *Bradyrhizobium*, em levantamento de diversos trabalhos realizado por DePolli et al. (1986) observou que não é possível fazer generalizações. A aplicação de fungicidas pode reduzir significativamente a população de *Bradyrhizobium* nas sementes (ANNAPURNA, 2005; CURLEY; BURTON, 1975; GUPTA, 1988; SINCLAIR, 1993; SINGH; LODHA, 1997; ANDRÉS, 1998b; CAMPO; HUNGRIA, 1999; BIKROL,

2005) e reduzir o número e a matéria seca de nódulos (ANDRÉS, 1998a; BIKROL, 2005). Entretanto, dependendo dos fungicidas aplicados nas sementes não são observados efeitos significativos sobre a nodulação (BIGATON, 2005).

Normalmente, a aplicação de fungicidas e inseticidas tem sido realizada antes da inoculação para diminuir os efeitos tóxicos sobre as células de bradirrizóbios. Presume-se que, além do princípio ativo e do pH, os solventes usados nas formulações dos produtos comerciais estejam entre os responsáveis pela mortalidade das bactérias (CAMPO; HUNGRIA, 2000). A presença dos produtos na rizosfera da soja altera os exsudatos das raízes (KOSSLAK, 1987; MARTENSSON, 1992) e, como consequência, também modificam a emissão dos sinais moleculares e os estágios iniciais da infecção radicular, diminuindo a nodulação e, conseqüentemente, a FBN (KOSSLAK, 1987; MARTENSSON, 1992, ANDRÉS, 1998a e b) assim, é necessário encontrar técnicas de utilização destes produtos no tratamento de sementes de soja sem comprometer a sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente, a nodulação (ARAÚJO, 2006; PEREIRA et al., 2010).

### **2.3 Adubação nitrogenada e inoculação das sementes**

Por meio do estudo das exigências nutricionais da soja foi possível adequar um melhor manejo da adubação, bem como a seleção de estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* spp., que melhoraram os efeitos dos inoculantes, substituindo completamente a adubação nitrogenada (EMBRAPA SOJA, 2013).

O N é considerado um dos principais elementos para a produção de soja (MALAVOLTA, 1987; SEIFFERT, 1990; FAGERIA, 1991). Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e a translocação de fotoassimilados, além da taxa de crescimento entre parte aérea e raízes. A deficiência de N na planta afeta primeiramente o crescimento foliar (TAIZ; ZEIGER, 2004). No solo, o N pode ser armazenado apenas na fração da matéria orgânica, mas muitos fatores podem influenciar na disponibilidade deste nutriente, tais como: a atividade microbiana, umidade, temperatura, quantidade de matéria orgânica, lixiviação, textura e manejo do solo (ZILLI et al., 2009).

A maioria dos solos brasileiros cultiváveis apresenta baixos teores disponíveis de N, o que torna necessário a aplicação de adubos nitrogenados. No entanto, seu aproveitamento é limitado pelo caráter dinâmico desse nutriente no solo (PAUL; CLARK, 1989). Dependendo das propriedades físicas, químicas, mineralógicas e biológicas do solo, o N aplicado ao solo

pode ser lixiviado, volatilizado, absorvido pelas plantas ou, ainda, imobilizado temporariamente na biomassa microbiana.

Resultados obtidos em todas as regiões onde a soja é cultivada indicam que a aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais na semeadura ou em cobertura dessa cultura, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, em sistemas de plantio direto ou convencional, não aumenta a produtividade da soja. Ao contrário, a aplicação de N mineral, em quantidade superior a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N, na semeadura, tende a inibir a formação de nódulos nas plantas de soja. Experimentos conduzidos utilizando até 400 kg ha<sup>-1</sup> de N, divididos em dez aplicações durante o ciclo da cultura da soja, não resultaram em aumento da produtividade (HUNGRIA, 2005).

Hellriegel e Wilfarth (1887) apresentaram em seus experimentos, pela primeira vez, que os nódulos das plantas leguminosas fixam N<sub>2</sub> essencialmente por meio de agentes infecciosos nas raízes. Estes agentes variaram na sua capacidade de nodular diferentes grupos de plantas. Um ano depois, Beijerinck isolou e descreveu os rizóbios e em 1896 a definição dos grupos de inculação já era uma ferramenta de uso prático (FRED, 1932). Tornou-se, então, comum o conhecimento de que poderia haver a inoculação de sementes de leguminosas, que fossem semeadas em áreas de primeiro ano de cultivo, ou nos primeiros anos (DAVIDSON; DAVIDSON, 1993). Os cientistas reconheceram, mais tarde, que havia uma relação muito mais específica entre cepas bacterianas e as espécies de leguminosas, em termos de infecciosidade, ou seja, a capacidade de nodular e a eficácia do processo de fixação de N<sub>2</sub>. Assim, estes estudos concluíram que deve haver uma compatibilidade entre a planta hospedeira e o rizóbio (HERRIDGE; ROSE, 2000).

Os rizóbios foram inicialmente agrupados em um único gênero, o *Rhizobium* Frank 1889 (KUYKENDALL, 1992). Jordan (1982) sugeriu uma separação taxonômica baseada em curvas de crescimento, para diferenciar os rizóbios de multiplicação rápida (*Rhizobium*), que levam de 3 a 4 h para o aparecimento de colônias visíveis, daqueles de multiplicação lenta, entre 6 a 10 h (*Bradyrhizobium*). Esse último gênero era composto por apenas uma espécie, *B. japonicum*, isolada a partir de nódulos de raízes de soja. Embora o termo rizóbio tenha sido utilizado inicialmente para designar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, mais recentemente ele vem sendo utilizado para todas as bactérias capazes de formar nódulos e fixar N em associação com leguminosas e/ou que pertençam a um gênero correlato ao das leguminosas (WILLEMS, 2007).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas de clima tropical e temperado (HOLT, 1994; SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). Na década de 80 e início da década de 90, vários trabalhos começaram a demonstrar que existia grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* (HOLLIS, 1981; STANLEY, 1985). Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja no Brasil, estas duas são pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (SEMIA - Seção de Microbiologia Agrícola) e a SEMIA 5019, recomendadas desde 1979, e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a SEMIA 5079 (CPAC-15) e a SEMIA 5080 (CPAC-7), que vêm sendo utilizadas intensamente em inoculantes comerciais desde 1992 (FAGAN, 2007).

As bactérias responsáveis pela FBN, em simbiose com leguminosas, compõem um grupo de microrganismos gram-negativos que podem ser encontrados naturalmente nos solos dos diversos biomas. Quando associado à planta, na forma de bacterióide, inserido no interior do nódulo do sistema radicular da leguminosa, estabelece-se uma relação simbiótica, mutualística, entre a bactéria e a planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa simbiose exerce um papel muito importante e diretamente efetivo na nutrição mútua, ocorrendo o fornecimento de N para a planta, que por sua vez disponibiliza compostos fotossintetizados aos microrganismos.

A formação do nódulo envolve uma série de trocas de moléculas sinalizadoras específicas entre a planta e a bactéria. A planta hospedeira secreta substâncias como aminoácidos, CO<sub>2</sub>, hormônios, ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, proteínas, flavonóides, entre outras (BROUGHTON, 2003). Flavonóides são compostos fenólicos sintetizados em várias partes da planta e podem funcionar como moléculas sinais para a simbiose com os microrganismos (GRAHAM, 1991; SUBRAMANIAN, 2007). Segundo Subramanian et al. (2007), as isoflavonas, que são uma classe de flavonóides, são indispensáveis para a nodulação em estirpes de *B. japonicum*, o principal simbionte de soja. Todavia, existem outros compostos não-flavonóides, como betaínas e xantonas, que também induzem a expressão dos genes de nodulação (SUBRAMANIAN, 2007).

A nodulação ocorre, aproximadamente, 2 horas após o contato da bactéria com as raízes. Quando as bactérias penetram o pêlo da raiz, em seguida promovem a divisão das células corticais e conduzem à formação do nódulo. Dessa forma, são internalizadas em um

compartimento circundado por uma membrana denominado de simbiossomo, onde passam a ser chamadas de bacterióides (VARGAS; HUNGRIA, 1997; HIRSCH, 2003; STACEY, 2006). Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI, 1980). As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA, 1994)

A fixação do N no nódulo ocorre quando os rizóbios rompem a ligação tríplice do N atmosférico e o transformam em  $\text{NH}_3$ , que é um N orgânico assimilável pelas plantas (BURRIS, 1999; TAIZ; ZIEGER, 2004). O complexo enzima-nitrogenase, formado por duas unidades proteicas, a Fe-proteína e a Mo-Fe-proteína, são responsáveis pela fixação de N no nódulo (BURRIS, 1999; MYLONA, 1995; TAIZ; ZIEGER, 2004).

Uma associação rizóbio-leguminosa eficiente, na qual a necessidade da planta por N seja totalmente suprida pela FBN, é o alvo de muitas pesquisas desenvolvidas no mundo, e principalmente nos trópicos (FERNANDES, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Por outro lado, a fixação eficiente depende de diversos fatores, como temperatura, umidade, características químicas e físicas do solo, os quais influenciam tanto a planta quanto a bactéria. De acordo com Smith e Hume em 1987, a associação do *Bradyrhizobium japonicum* com a soja resultava numa fixação de N de até  $102,9 \text{ kg de N ha}^{-1}$ . Hoje devido aos avanços genéticos e o melhoramento de plantas e microrganismos, associados a melhoria da tecnologia de produção, a FBN em ambientes favoráveis tem possibilitado a fixação de  $300 \text{ kg de N ha}^{-1}$  (HUNGRIA et al., 2005).

Todavia, a aplicação tradicional, via semente, nem sempre é eficiente, principalmente pela aplicação conjunta do rizóbio com fungicidas, inseticidas e micronutrientes, que contribuem para causar toxidez às bactérias e danos às vezes irreversíveis às sementes (VARGAS, 1994).

Recentemente, aditivos constituídos por lipídeos e oligossacarídeos têm sido vendidos no mercado visando proteger as células bacterianas inoculadas às sementes de soja. Portanto, pressupõem-se que o uso de aditivo proteja os bradirrizóbios da ação de fungicidas utilizados em tratamentos de sementes de soja, possibilitando inocular as sementes imediatamente após o tratamento, mesmo quando a semeadura for realizada após algumas horas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado nos anos agrícolas de 2013/2014 e 2014/2015, em área localizada na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no município de Maringá, região noroeste do Estado do Paraná, situada a uma latitude de 23°25' sul e longitude de 51°57' a oeste de Greenwich, com altitude média de 540 m.

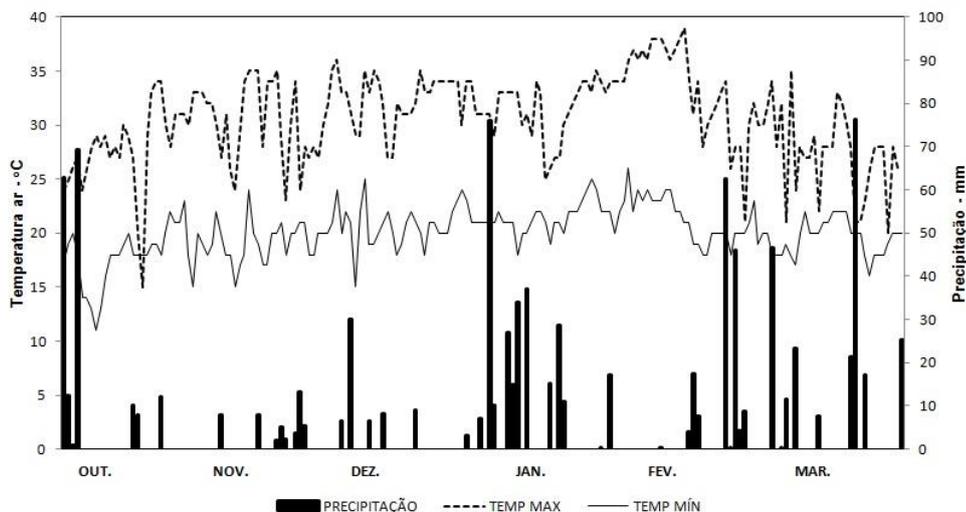
O solo da área experimental foi classificado como Argissolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006), de textura média. Foi realizada a análise química e física do solo antes da instalação do experimento, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultado da análise química e física do solo da área experimental, antes da implantação da cultura (Maringá/PR, UEM – 2013/2014).

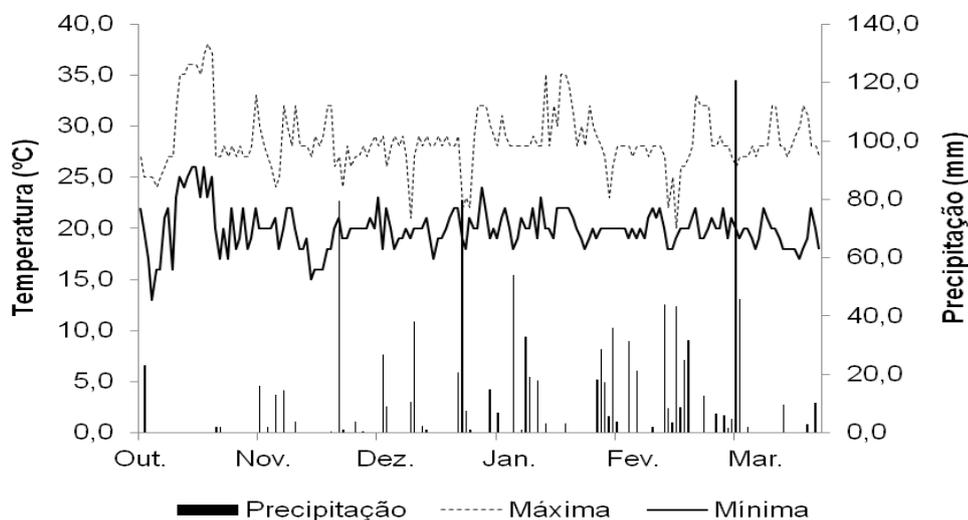
Prof. (cm)	<sup>1</sup> P	<sup>2</sup> pH		$H^+ + Al^{3+}$	$Al^{3+}$	<sup>1</sup> K	<sup>3</sup> Ca	<sup>3</sup> Mg	SB	CTC	V	<sup>4</sup> C
	mg dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			-----			%	g dm <sup>-3</sup>	
	4,66	5,21	5,78	2,63	0,00	0,61	3,08	2,18	5,87	8,5	69,05	10,52
	<sup>5</sup> S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Zn	Fe	Cu	Mn	Areia grossa		Areia fina	Argila	Silte		
0 – 20	-----mg dm <sup>-3</sup> -----			-----			-----%			-----		
	8,26	3,07	90,25	14,04	94,13	13,70		30,10	54,65	1,55		

<sup>1</sup> - Extrator Mehlich 1; <sup>2</sup> - CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>; <sup>3</sup> - KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; <sup>4</sup> - Método Walkley-Black; <sup>5</sup> - Método Fosfato Monocálcico.

O clima predominante na região é do tipo Cfa - subtropical úmido mesotérmico caracterizado pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e possível concentração de chuvas no período de verão (IAPAR, 1987). Foram coletados os dados locais de precipitação pluvial e temperatura máxima e mínima diária, referentes aos períodos de duração dos experimentos em campo, os quais se encontram ilustrado nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1.** Dados climáticos, em decêndios, da precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas, entre outubro de 2013 e março de 2014, na Fazenda Experimental de Iguatemi (Maringá – PR, 2013/2014). Fonte: Laboratório de Análises de Sementes - FEI/UEM.



**Figura 2.** Dados climáticos, em decêndios, da precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas, entre outubro de 2014 e março de 2015, na Fazenda Experimental de Iguatemi (Maringá – PR, 2014/2015). Fonte: Laboratório de Análises de Sementes - FEI/UEM.

As instalações e conduções das lavouras experimentais, nos dois anos agrícolas, foram realizadas de acordo com os pressupostos da Embrapa Soja (2013). A quantidade de adubo utilizado foi seguindo as recomendações da Embrapa (2004), objetivando produzir 3.500 kg ha<sup>-1</sup> de sementes, em média. Na adubação foram utilizados 350 kg ha<sup>-1</sup> do formulado 0-20-20 (N – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – K<sub>2</sub>O), com uso de semeadora-adubadora, com espaçamento ajustado para 45 cm entrelinhas.

O sistema de semeadura empregado foi o convencional, em solo preparado 15 dias antes da semeadura da cultura. A semeadura, no primeiro ano agrícola foi realizada no dia 28 de outubro, e no ano agrícola seguinte (2014/2015), no dia 17 de outubro.

A cultivar de soja utilizada na semeadura foi a BMX Potência RR (Empresa BRASMAX), pertencente ao grupo de maturação semiprecoce (6.7 da classificação Norte-Americana) e dotada do hábito de crescimento indeterminado.

Os tratamentos foram constituídos de dois inseticidas e dois fungicidas para o tratamento industrial de sementes (TIS 1 e 2), seis tratamentos de inoculação, inoculação padrão das sementes e três períodos de pré-inoculação (0, 5 e 10 dias antes da semeadura), um tratamento com adubação nitrogenada e uma testemunha. Na Tabela 2 estão especificados os tratamentos, bem como os produtos utilizados.

Os inoculantes utilizados (inoculante padrão e LT) são na formulação líquida, produzidos pela empresa Stoller do Brasil Ltda. e possuem como garantia as bactérias *Bradyrhizobium elkanni* (cepa SEMIA 5019) e *Bradyrhizobium japonicum* (cepa SEMIA 5079), na concentração de 5 x 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. O inoculante LT foi registrado pelo MAPA, mas ainda não está disponível para comercialização. Este, segundo a empresa fabricante, se diferencia do inoculante padrão por possuir aditivos constituídos por lipídeos e oligossacarídeos, que melhora as condições fisiológicas das bactérias e permite adequada atividade destas até 10 dias de intervalo entre o tratamento e a semeadura.

**Tabela 2.** Tratamentos com aplicação dos inoculantes padrão líquido (L) e inoculante LT em sementes de soja, aos 0, 5 e 10 dias antes da semeadura da cultura, além da testemunha e tratamento com adubação nitrogenada (Maringá – PR, safras 2013/14 e 2014/15).

Nº	Tratamentos
1	Testemunha
2	200 kg ha <sup>-1</sup> de N
3	Inoculante padrão L (2 mL kg <sup>-1</sup> )
4	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 0 dias
5	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 5 dias
6	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 10 dias
7	Inoculante padrão L (2 mL kg <sup>-1</sup> )
8	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 0 dias
9	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 5 dias
10	Inoculante LT (2 mL kg <sup>-1</sup> ) – 10 dias

\*Carbendazim e thiram (Derosal Plus<sup>®</sup>) (100 mL 50 kg<sup>-1</sup>de sementes) + imidacloprido e tiodicarbe (Cropstar<sup>®</sup>) (250 mL 50 kg<sup>-1</sup>de sementes);

\*\*Fludioxonil (Maxim Advanced<sup>®</sup>) (50 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes) + thiametoxan (Cruiser 350FS<sup>®</sup>) (100 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes).

Logo após o tratamento de sementes, foi realizada a semeadura manual, no sulco de semeadura com espaçamento de 0,45 m entre linhas, na profundidade de, aproximadamente, três centímetros e uma densidade de semeadura de 15 sementes por metro linear, apresentando densidade final de 12 plantas por metro linear. As parcelas foram constituídas de sete linhas de cinco metros de comprimento. Para as avaliações, foi utilizada uma área útil de 5,4 m<sup>2</sup>, em que foram consideradas as 3 fileiras centrais para rendimento, tendo como bordadura as 2 fileiras de cada lateral e 0,50 metros de cada extremidade das fileiras centrais.

Nos dois anos agrícolas foi utilizado o mesmo manejo, sendo que durante o desenvolvimento da cultura foram realizadas capinas manuais e aplicação do herbicida Roundup<sup>®</sup> (Glyphosate), na dosagem de 3 L ha<sup>-1</sup>, para o controle das plantas daninhas. Para o controle de pragas e doenças, respeitando o nível de dano econômico, foram utilizados os seguintes produtos: Premio<sup>®</sup> a 60 mL ha<sup>-1</sup> e Ampligo<sup>®</sup> a 50 mL ha<sup>-1</sup>, para o controle de lagartas; Connect<sup>®</sup> (Piretróide + Imidacloprido) a 750 mL ha<sup>-1</sup> e Engeo Pleno<sup>®</sup> (Piretróide + Tiametoxam) a 200 mL ha<sup>-1</sup> para o controle de percevejos e vaquinhas. A aplicação dos

fungicidas Opera® (Epoconazole + Pyraclostobin), na dosagem de 500 mL ha<sup>-1</sup> e Priori Xtra® (Azoxystrobin + Ciproconazole), na dose de 300 mL ha<sup>-1</sup>, foi utilizada no controle da ferrugem asiática e complexo de doenças de final de ciclo.

### 3.2 Características avaliadas

As variáveis resposta avaliadas nos dois anos agrícolas foram as seguintes: número de nódulos por planta, massa de nódulos, massa seca da parte aérea, teor de N na parte aérea, número de vagens por planta, teor de N nas sementes, massa de mil sementes e produtividade de sementes.

As avaliações da nodulação e massa seca da parte aérea foram realizadas quando as plantas estavam no estágio R<sub>2</sub>, ou seja, quando a planta possui a maioria dos seus racemos com flores abertas (floração plena) (RITCHIE,1982). Coletou-se, então, dez plantas por parcela aleatoriamente na área útil de cada parcela, exceto nas fileiras destinadas ao rendimento. Para a contagem e pesagem dos nódulos, tomou-se o cuidado de manter o volume de solo pré-estabelecido para cada planta de 0,032 m<sup>3</sup>, com dimensões de 0,4 (L<sub>1</sub>) x 0,4 (L<sub>2</sub>) x 0,2 (H), coletadas com auxílio da pá-de-corte, centralizando a planta no quadro 0,4 (L<sub>1</sub>) x 0,4 (L<sub>2</sub>) m, após uma chuva constante. Posteriormente, foram separadas raízes, nódulos e solo da amostra, com auxílio de peneira com malha de 3 mm e água corrente para limpeza do solo aderido às partes vegetais. Após drenagem do excesso de água das plantas, os nódulos e a parte aérea foram acondicionados em sacos de papel, identificados com suas respectivas partições (nódulos e parte aérea) e realizada a contagem do número de nódulos por planta. Em etapa seguinte, foram levados para secagem em estufa a 105 ± 3°C por 24h e determinada a massa de nódulos e parte da aérea.

Para o número de vagens por planta foram realizadas contagens em 10 plantas escolhidas aleatoriamente na parcela experimental, no estágio R<sub>7</sub>.

Em relação ao rendimento, as plantas foram colhidas manualmente, cinco dias após o estágio de desenvolvimento R<sub>8</sub>, ou seja, quando 95% das vagens apresentavam a coloração típica de vagem madura (FEHR, 1971). Após a colheita das plantas, as vagens foram debulhadas em máquina trilhadora estacionária, limpas com o auxílio de peneiras e secas em condições naturais e acondicionadas em sacos de papel “Kraft”.

Partindo-se do rendimento de sementes nas parcelas foram calculadas as produtividades em kg ha<sup>-1</sup>, para cada tratamento. Em seguida, foi determinada a massa de mil sementes, por meio da pesagem de oito subamostras de 100 sementes, para cada repetição de campo, com o auxílio de balança analítica com precisão de um miligrama, multiplicando-se os resultados por 10 (BRASIL, 2009). Para o cálculo da produtividade e da massa de mil sementes, o grau de umidade, determinado por meio do método de estufa a 105 ± 3°C por 24 horas (BRASIL, 2009), foi corrigido para 13% base úmida.

A determinação do N nas sementes e na parte aérea foi realizada utilizando-se o método de Kjeldahl, na quantificação de N total, conforme recomendação da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C., 2016) e Vitti et al. (2001). Foram analisadas duas subamostras de 0,2 g da farinha das sementes coletadas no estádio R<sub>8</sub> e das folhas secas e moídas, coletadas no estádio R<sub>2</sub>, provenientes de amostras de cada repetição de campo. A farinha foi condicionada em tubos de ensaio, junto com 2 g de uma mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e selênio em pó) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado; estes tubos foram, então, levados para aquecimento em um bloco digestor para a fase de digestão da matéria orgânica. O aquecimento foi gradual e, assim que a temperatura de 350°C foi atingida, o material permaneceu a esta temperatura constante por mais 2,5h. Após a obtenção do material digerido, iniciou-se a fase de destilação da amônia liberada, após a reação com hidróxido de sódio (50%), sendo recolhida em solução de ácido bórico a 4%. A volumetria de titulação foi realizada com solução-padrão de ácido clorídrico a 1 mol L<sup>-1</sup>, em que os indicadores foram o vermelho de metila (0,2%) e o azul de metila (0,2%). Com este procedimento, obteve-se, a recuperação de 99,7% do N total.

### **3.3 Número mais provável (NMP) de *Bradyrhizobium* spp. e bactérias diazotróficas endofíticas presentes no solo da área experimental**

A primeira metodologia (Metodologia 1) consiste na inoculação de diluições seriadas das amostras, em plantas testes específicas, cultivadas em condições assépticas, avaliando a formação de nódulos. Já, a metodologia 2, também consiste em inoculação de diluições seriadas das amostras, porém em meio semi-sólido NFb, avaliando a presença de película nos frascos do teste, que é características dos organismos diazotróficos associativos.

<b>Produto/Lote</b>	<b>Número de células de bactérias g<sup>-1</sup></b>
Código Interno 071/13	<b>7,23 10<sup>2</sup> bactérias g<sup>-1</sup></b> (Metodologia 1*)
Código Interno 071/13	<b>9,5 10<sup>5</sup> bactérias g<sup>-1</sup></b> (Metodologia 2**)

**Fonte:** Certificado de Análise: contagem de células pelo número mais provável, Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Out., 2013.

### **3.4 Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com quatro repetições. A análise estatística foi realizada após as pressuposições básicas para a análise de variância serem atendidas. Posteriormente, os dados coletados foram submetidos à análise de variância conjunta para verificar a semelhança dos quadrados médios pelo teste de Hartley (BANZATTO; KRONKA, 2008). A análise conjunta dos dados foi realizada para os diferentes tratamentos, quando a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (BANZATTO; KRONKA, 2008).

Para as comparações das médias dos efeitos dos tratamentos (fator qualitativo de efeito fixo), foram estabelecidos os seguintes contrastes ortogonais, apresentados na Tabela 3.

Como são contrastes ortogonais, usou-se o teste F, em nível de 5% de probabilidade, para testá-los, de acordo com Gomes e Garcia (2002). A análise estatística dos dados coletados foi realizada por meio dos softwares SISVAR (FERREIRA, 2000) e SAS (INSTITUTE, 1990).

**Tabela 3.** Contrastes ortogonais para a comparação das médias dos tratamentos.

<b>C1</b> = Testemunha vs todos =	$9T1 - T2 - T3 - T4 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10$
<b>C2</b> = 200 kg ha <sup>-1</sup> de N vs todos =	$8T2 - T3 - T4 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10$
<b>C3</b> = TIS1 vs TIS2 =	$T3 + T4 + T5 + T6 - T7 - T8 - T9 - T10$
<b>C4</b> = Inoc. Padrão (TIS1) vs Inoc. LT (TIS1) =	$3T3 - T4 - T5 - T6$
<b>C5</b> = Inoc. LT 0 dia (TIS1) vs 5 e 10 dias (TIS1) =	$2T4 - T5 - T6$
<b>C6</b> = Inoc. LT 5 dias (TIS1) vs 10 dias (TIS1) =	$T5 - T6$
<b>C7</b> = Inoc. Padrão (TIS2) vs Inoc. LT (TIS2) =	$3T7 - T8 - T9 - T10$
<b>C8</b> = Inoc. LT 0 dia (TIS2) vs 5 e 10 dias (TIS2) =	$2T8 - T9 - T10$
<b>C9</b> = Inoc. LT 5 dias (TIS2) vs 10 dias (TIS2) =	$T9 - T10$

Inoc.: inoculante líquido.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados da análise de variância

A análise estatística foi realizada após as pressuposições básicas para a análise de variância terem sido atendidas. Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os quadrados médios e os coeficientes de variação para as variáveis resposta analisadas, em relação aos diferentes tratamentos de pré-inoculação das sementes tratadas industrialmente. Estes resultados revelaram efeitos significativos, a 5% de probabilidade, para todas as variáveis analisadas nos dois anos agrícolas.

Para a análise de variância conjunta, verificou-se a semelhança dos quadrados médios pelo teste de Hartley (BANZATTO; KRONKA, 2008), quando a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (BANZATTO; KRONKA, 2008). Assim, para as variáveis massa de nódulos, massa seca de parte aérea e teor de N na parte aérea, a relação foi superior a sete, indicando a impossibilidade da realização da análise conjunta. Nesse caso, é possível realizar a análise individual por ano para essas variáveis. Para as demais variáveis foi possível realizar a análise conjunta dos dados dos dois anos agrícolas, já que esta relação foi inferior a sete.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância, referente ao número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), teor de N na semente (TNS), número de vagens por planta (NVAG), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, com diferentes formulações, para a cultivar BMX Potência RR, no ano agrícola de 2013/2014. (UEM, Maringá – PR).

FV	GL	Quadrado médio							
		NNOD	MNOD	MSPA	TNPA	TNS	NVAG	MMS	PROD
Trat.	9	219,8729*	664,4517*	65,4104*	0,6156*	0,2492*	260,8178*	263,3932*	1253136,1934*
Bloco	3	107,9237 <sup>ns</sup>	318,6086 <sup>ns</sup>	23,8999 <sup>ns</sup>	0,0331 <sup>ns</sup>	0,0432 <sup>ns</sup>	260,8178 <sup>ns</sup>	47,1682 <sup>ns</sup>	165602,1446 <sup>ns</sup>
Erro	27	34,7383	109,9138	9,5474	0,0989	0,0309	260,8178	28,1302	178658,4434
TOTAL	39								
C.V. (%)	-	24,87	33,66	20,57	6,47	2,43	8,75	5,5	15,32

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> não-significativo.

**Tabela 5.** Resumo da análise de variância, referente ao número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), teor de N na semente (TNS), número de vagens por planta (NVAG), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, com diferentes formulações, para a cultivar BMX Potência RR, no ano agrícola de 2014/2015. (UEM, Maringá – PR).

FV	GL	Quadrado médio							
		NNOD	MNOD	MSPA	TNPA	TNS	NVAG	MMS	PROD
Trat.	9	528,3917*	763,5936*	71,0839*	4,1208*	19,6947*	1647,5575*	23,1519*	235163,947*
Bloco	3	4,1583 <sup>ns</sup>	0,6354 <sup>ns</sup>	0,2652 <sup>ns</sup>	0,0009 <sup>ns</sup>	0,0484 <sup>ns</sup>	94,7005 <sup>ns</sup>	7,8774 <sup>ns</sup>	23832,8792 <sup>ns</sup>
Erro	27	37,1028	2,6204	0,4478	0,0006	0,0562	50,3249	16,8701	37608,3147
TOTAL	39								
C.V. (%)		22,09	4,97	4,58	0,42	2,63	14,18	4,03	5,88

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste f. <sup>NS</sup> não-significativo.

## 4.2 Resultados da análise por contrastes ortogonais

Os resultados dos contrastes ortogonais, utilizados para analisar o comportamento dos tratamentos de pré-inoculação, para as variáveis massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de N na parte aérea (TNPA), nos anos agrícolas 2013/14 e 2014/15, respectivamente, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6.** Resultados da análise dos contrastes ortogonais pelo teste F para massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de N na parte aérea (TNPA), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, no ano agrícola de 2013/2014. (UEM, Maringá – PR).

Contrastes		Estimativas dos contrastes		
		MNOD	MSPA	TNPA
<b>C1</b>	Testemunha vs todos =	-718,83*	-67,74*	-8,44*
<b>C2</b>	200 kg ha <sup>-1</sup> de N vs todos =	-678,04 <sup>NS</sup>	-42,20 <sup>NS</sup>	1,69 <sup>NS</sup>
<b>C3</b>	TIS 1 vs TIS 2 =	-138,31 <sup>NS</sup>	2,87 <sup>NS</sup>	-1,37*
<b>C4</b>	Inoc. Padrão (TIS 1) vs Inoc. LT (TIS 1) =	134,51*	-11,59*	0,29*
<b>C5</b>	Inoc. LT 0 dia (TIS 1) vs 5 e 10 dias (TIS 1) =	25,39 <sup>NS</sup>	6,06 <sup>NS</sup>	-0,20 <sup>NS</sup>
<b>C6</b>	Inoc. LT 5 dias (TIS 1) vs 10 dias (TIS 1) =	93,01 <sup>NS</sup>	-6,76*	-0,37 <sup>NS</sup>
<b>C7</b>	Inoc. Padrão (TIS 2) vs Inoc. LT (TIS 2) =	-43,72*	7,64*	0,69 <sup>NS</sup>
<b>C8</b>	Inoc. LT 0 dia (TIS 2) vs 5 e 10 dias (TIS 2) =	-103,70 <sup>NS</sup>	6,16 <sup>NS</sup>	0,77 <sup>NS</sup>
<b>C9</b>	Inoc. LT 5 dias (TIS 2) vs 10 dias (TIS 2) =	54,96*	-5,64*	-0,07*

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> não-significativo.

O estudo dos contrastes possibilitou isolar o efeito dos tratamentos, com a finalidade de investigar quais tratamentos influenciaram na nodulação, nos teores de N e nos componentes de produção da cultivar BMX Potência RR.

A comparação da testemunha com os demais tratamentos, observada por meio do contraste C1, indicou que, em média, foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas, no ano agrícola de 2013/14 (Tabela 6). Neste sentido, tem-se que a adição de qualquer um dos inoculantes utilizados neste experimento adicionados às

sementes ou a aplicação isolada de 200 kg ha<sup>-1</sup> de N incrementou as variáveis analisadas, em comparação com a testemunha.

Analisando as variáveis massa de nódulo, massa seca de parte aérea e teor de N na parte aérea, no ano agrícola de 2013/2014, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, no contraste C2, onde é feita a comparação entre o tratamento 2 (200 kg ha<sup>-1</sup> de N), com o grupo formado pelos demais tratamentos. Porém, como já explanado nesse trabalho, o uso do N aplicado a lanço, após a semeadura, tem seu aproveitamento limitado pelo caráter dinâmico desse nutriente no solo (PAUL; CLARK, 1989). Dependendo das propriedades físicas, químicas, mineralógicas e biológicas do solo, o N aplicado pode ser lixiviado, volatilizado, absorvido pelas plantas ou, ainda, imobilizado temporariamente na biomassa microbiana. De acordo com Zilli et al. (2010), a FBN é a fonte mais viável de N para a soja, considerando os aspectos econômicos e ambientais. A FBN pode, dependendo de sua eficiência, fornecer todo o N que a soja necessita (EMPRAPA, 2004). Resultados semelhantes a este também foram observados em avaliações conduzidas nos cerrados de Roraima, onde se aplicaram cerca de 200 kg ha<sup>-1</sup> de N, parcelados em duas vezes, e o rendimento de grãos não apresentou diferença significativa dos demais tratamentos em que as sementes foram inoculadas (ZILLI, 2005; 2006; 2008). Segundo Hungria et al. (2007), o uso de fertilizantes nitrogenados minerais para a cultura da soja, reduziu a nodulação das plantas, e sua utilização não possibilitou nenhum incremento de produtividade frente à inoculação. No entanto, para o mesmo trabalho, os autores verificaram que, se as fórmulas de adubo que contêm N forem mais econômicas do que as fórmulas sem N, elas poderão ser utilizadas, desde que não sejam aplicados mais do que 20 kg de N ha<sup>-1</sup>.

No contraste C3, em que são comparados os tratamentos em que se utilizou carbendazim e thiram + imidacloprido e tiodicarbe (TIS 1), com os tratamentos que foi utilizado fludioxonil + tiametoxam (TIS 2), observa-se que, no ano agrícola de 2013/2014, os tratamentos com efeito do TIS 2 superaram, em média, os tratamentos sob os efeitos do TIS 1, em relação ao teor de N na parte aérea (Tabela 6).

O imidacloprido e tiodicarbe, contido no TIS 1, tem um efeito mais pronunciado no desempenho das sementes de soja, reduzindo o seu vigor, quando as sementes são tratadas e armazenadas (DAN et al., 2011), ao contrário do tiametoxam contido no TIS 2, que tem sido considerado como bioestimulante por diversos autores (DAN et al., 2013). Esse mesmo tratamento de sementes com imidacloprido e tiodicarbe também leva a um efeito deletério

sobre as células da bactéria, daí o fato de ter promovido maior teor de N na parte aérea das plantas de soja. Os mesmos autores sugerem, ainda, em seu trabalho, que o produto seja aplicado da forma “trate e plante”, ou seja, evitar o armazenamento das sementes tratadas com o referido produto, mesmo por períodos relativamente curtos de armazenamento (7 dias).

O contraste C4 comparou o tratamento 4 com o grupo dos tratamentos 5, 6 e 7. Por isso, pode-se mencionar que este compara a utilização do inoculante padrão com o uso do inoculante LT, nas sementes tratadas com o TIS 1. Assim, na Tabela 6, foram observadas diferenças significativas para todas as variáveis analisadas. Com isso, é possível inferir que a utilização do Inoculante LT proporcionou maior massa seca de parte aérea. Por outro lado, a utilização do inoculante padrão demonstrou maiores valores para variável massa de nódulos e teor de N na parte aérea.

O contraste C5 consiste em comparar os efeitos dos diferentes períodos de armazenamento das sementes tratadas com o TIS 1, sendo que se comparou o tratamento em que não houve armazenamento, ou seja, onde as sementes foram tratadas industrialmente com o TIS 1 mais o inoculante LT, logo antes da semeadura, com o grupo dos tratamentos em que as sementes foram tratadas e inoculadas por 5 e 10 dias antes da semeadura, com o mesmo inoculante. Para as variáveis MNOD, MSPA e TNPA, no ano agrícola de 2013/2014, não houve diferença significativa entre os grupos comparados. Por isso, os resultados obtidos permitem inferir que, para estas variáveis analisadas, não houve diferença entre a realização da inoculação, com o inoculante LT, das sementes tratadas e inoculadas momento da semeadura ou 5 e 10 dias antes da semeadura. Rufino (2013), utilizando um produto aditivo que possui lipídeos e oligossacarídeos, assim como o inoculante LT, verificou que a utilização deste composto permite a pré-inoculação das sementes de soja por até 15 dias antes da semeadura; contudo, este mesmo autor não avaliou a utilização de produtos químicos no tratamento de sementes, em conjunto com a pré-inoculação.

No contraste C7, assim como no contraste C4, foi realizada a comparação entre o tratamento com o inoculante padrão, com os tratamentos utilizando o inoculante LT (Tabela 6). Porém, a diferença é que esta comparação foi realizada entre sementes tratadas com o TIS 2. Nesse mesmo ano agrícola (2013/2014) foram obtidos resultados inversos aos observados para o contraste C4, com relação à MNOD e MSPA, já que a utilização do inoculante padrão influenciou os tratamentos a apresentarem menor massa de nódulos e maior massa seca.

Analisando os resultados do contraste C8, na Tabela 6, em que foram comparados os períodos de armazenamento de 5 e 10 dias das sementes pré-inoculadas com o inoculante LT, em comparação com a inoculação no momento da semeadura, utilizando o TIS 2, observa-se que não houve diferença entre os tratamentos, assim como no contraste C5. Nesse caso, os resultados permitem inferir que, para as variáveis resposta analisadas, não há diferença entre inocular as sementes no momento da semeadura ou até 10 dias antes.

No contraste C9, a variável MNOD foi significativa, o que nesse caso, representa que o armazenamento das sementes tratadas industrialmente com o TIS 2 e inoculadas por 10 dias causou redução dessas variáveis, em comparação com as sementes pré-inoculadas por 5 dias. Estes dados corroboram com Alcântara Neto et al. (2014), Pereira et al. (2009) e Santos et al. (2013), que avaliaram o efeito do tempo, após a aplicação dos produtos fludioxonil + metalaxil-M e do inoculante, e observaram que o tratamento utilizado provocou redução na população de rizóbios e no número de nódulos, com o aumento do tempo. Segundo Campo et al. (2009), alguns fungicidas comprometem a simbiose por afetar a sinalização rizóbio-planta.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados dos contrastes ortogonais para as variáveis massa de nódulos, massa seca de parte aérea e teor de N na parte aérea, no ano agrícola de 2014/2015. Da mesma forma que ocorreu no ano agrícola anterior, a análise do contraste C1 permitiu observar que todos os tratamentos com aplicação de inoculante às sementes de soja, bem como a adubação do solo com 200 kg ha<sup>-1</sup> de N, promoveram aumento nas três variáveis resposta mencionadas anteriormente, em comparação com a testemunha.

No contraste C2 (Tabela 7) pode-se inferir que a utilização de qualquer tratamento que envolve a inoculação das sementes foi benéfica, quando comparada a sua não utilização (Tabela 7). Isso se deve ao fato de que nesse ano agrícola, a partir de julho, as temperaturas começaram a aumentar e os meses de agosto, setembro e outubro de 2014 se caracterizaram por apresentar um aumento acentuado nas temperaturas diárias, quando comparados aos valores médios de temperatura registrados (SIMEPAR, 2014). Com isso, a irregularidade e a escassez de chuvas, aliadas a temperaturas elevadas, principalmente no mês de outubro e parte de novembro, quando ocorreu a semeadura, conforme observado na Figura 2, pode ter influenciado nas variáveis analisadas.

**Tabela 7.** Resultados dos contrastes ortogonais pelo teste F para massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de N na parte aérea (TNPA), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, no ano agrícola de 2014/2015. (UEM, Maringá – PR).

Contrastes		Estimativas dos contrastes		
		MNOD	MSPA	TNPA
<b>C1</b>	Testemunha vs todos =	-813,94*	-65,00*	-20,51*
<b>C2</b>	200 kg ha <sup>-1</sup> de N vs todos =	-755,57*	-47,27*	-10,86*
<b>C3</b>	TIS 1 vs TIS 2 =	-114,33*	-17,83*	-1,49*
<b>C4</b>	Inoc. Padrão (TIS 1) vs Inoc. LT (TIS 1) =	44,99*	-10,30*	-2,36*
<b>C5</b>	Inoc. LT 0 dia (TIS 1) vs 5 e 10 dias (TIS 1) =	108,14*	-9,33*	-1,29*
<b>C6</b>	Inoc. LT 5 dias (TIS 1) vs 10 dias (TIS 1) =	70,56*	1,15*	0,32*
<b>C7</b>	Inoc. Padrão (TIS 2) vs Inoc. LT (TIS 2) =	119,50*	-13,29*	-3,74*
<b>C8</b>	Inoc. LT 0 dia (TIS 2) vs 5 e 10 dias (TIS 2) =	-68,79*	0,52*	-0,23*
<b>C9</b>	Inoc. LT 5 dias (TIS 2) vs 10 dias (TIS 2) =	89,21*	2,03 <sup>NS</sup>	0,82*

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> não-significativo.

Considerando que a semeadura foi realizada com o solo úmido e que a adubação nitrogenada, utilizando uréia, foi aplicada a lanço, isto acarreta em maiores perdas do N por volatilização de NH<sub>3</sub>, que são dependentes do manejo do solo e das condições climáticas (BRANDÃO, 1992). Quando aplicado na superfície do solo, principalmente em solos úmidos, há baixa eficiência desse adubo, aumentando a perda de NH<sub>3</sub> por ação da urease (BOUWMEESTER, 1985; RAUN; JOHSON, 1999). A urease é uma enzima produzida por microorganismos do solo, principalmente bactérias, que facilita a quebra da molécula de ureia, transformando-a de volta em amônia, gás carbônico e água, causando altas perdas de N para a atmosfera (BYRNES, 2000). A umidade do solo é outro fator que influencia na sua atividade, já que quando não há umidade suficiente para a incorporação da ureia no solo, as perdas são significativamente acentuadas. Sua atividade ainda é influenciada por alguns fatores, como a temperatura, que quanto mais elevada, maior o aumento na hidrólise da uréia e na taxa de transporte de NH<sub>3</sub> da solução para a atmosfera (BREMNER; MULVANEY,

1978; SOMMER, 2004). Assim, para este ano agrícola, foi possível verificar diferenças significativas para as variáveis analisadas.

No contraste C3 da Tabela 7, observa-se a influência significativa dos tratamentos com o TIS 2 nas variáveis MNOD, MSPA e TNPA, em comparação com o TIS 1. Com isso, foi possível constatar que o TIS 1 reduziu estas variáveis. Estes resultados corroboram com os obtidos por Bueno et al. (2003), que avaliaram o efeito de fungicidas na sobrevivência e nodulação de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) e obtiveram resultados *in vitro* que demonstraram efeito negativo e significativo das combinações dos fungicidas carbendazim + thiram. Da mesma forma, Araujo e Carvalho (2006) concluíram que houve um efeito deletério destes princípios ativos na sobrevivência dos rizóbios em soja e feijão-caupi. Nesse caso, a redução do número de nódulos por toxidez da mistura dos fungicidas carbendazim + thiram sobre as bactérias fixadoras de N, fez com que houvesse um menor aporte de N para a parte aérea das plantas, reduzindo o teor de N na parte aérea (Tabela 7). Com relação aos inseticidas utilizados, Lamas et al. (2014) identificaram que fludioxonil + tiametoxam, independentemente da concentração utilizada, não prejudicou a nodulação.

Tratando-se da nodulação e, conseqüentemente, do crescimento de plantas de soja, Pereira et al. (2010) comentaram que a interferência de produtos químicos na atuação da FBN depende da estirpe utilizada durante a inoculação e não somente do princípio ativo empregado no tratamento de sementes. Dan et al. (2011), estudando o tratamento de sementes com inseticida sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja, concluíram que os tratamentos com tiametoxam, fipronil e imidacloprido proporcionaram uma adequada qualidade fisiológica das sementes, medidos pela porcentagem e pela velocidade de germinação, e não interferiram negativamente no desenvolvimento inicial da soja, medido pela altura das plantas. Já os inseticidas imidacloprido + tiodicarbe, acefato e carbofuran prejudicaram a germinação e o vigor das sementes de soja, assim como reduziram a altura das plantas, principalmente em condições de estresse.

Analisando o contraste C4 no ano de 2014/2015, todas as variáveis analisadas foram significativas. Neste caso, pode-se dizer que a utilização do inoculante padrão proporcionou uma maior massa de nódulos. Por outro lado, utilizando-se o inoculante LT, obteve-se um maior teor de N na parte aérea e uma maior massa seca de parte aérea. A obtenção destes dados, neste ano de 2014, pode ter ocorrido, como mencionado anteriormente, devido ao fato de que neste ano agrícola houve um menor volume de precipitação, bem como temperaturas

mais altas que o normal, após a semeadura da cultura, conforme pode ser visualizado na Figura 2. O efeito benéfico do inoculante LT pode ter ocorrido em virtude do mesmo possuir base lipídica e oligossacarídica, que proporciona um efeito osmoprotetor, reduzindo o efeito da dessecação e favorecimento da manutenção do microambiente da semente, bem como seu efeito antioxidante, que reduz o estresse oxidativo das membranas celulares e melhora a distribuição dos produtos sobre a semente (MARKS, 2008).

No contraste C5 (Tabela 7), pode-se observar que houve diferença estatística para todas as variáveis analisadas. Neste caso, é possível mencionar que houve diferença em se inocular as sementes no momento da semeadura e até dez dias antes. As sementes que não foram armazenadas apresentaram maior massa de nódulos, ao passo que as sementes que foram pré-inoculadas possuíram maior MSPA e maior TNPA.

O contraste C6, no ano agrícola de 2014/2015, os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas, sendo que o armazenamento das sementes inoculadas por 5 dias apresentaram valores superiores aos de 10 dias, nas variáveis resposta MNOD, MSPA e TNPA (Tabela 7). Estes dados corroboram com Campo e Hungria (2007), que em avaliações realizadas em diversos experimentos no Brasil, durante quatro anos consecutivos, indicaram ser possível a inoculação antecipada das sementes da soja em até cinco dias antes da semeadura. Zilli et al. (2010), também demonstraram que a inoculação em pré-semeadura, 5 dias antes, foi eficaz, não evidenciando diferenças dos resultados obtidos, quando a inoculação foi realizada no momento da semeadura, o que possibilitaria ao produtor realizar a inoculação previamente à semeadura e executá-la no momento mais oportuno.

No ano agrícola de 2014/2015, os dados analisados no contraste C7 apresentaram-se significativos para as três variáveis analisadas na Tabela 7. Com base nestes resultados, é possível inferir que utilizando o inoculante padrão teremos uma maior massa de nódulos, ao passo que o grupo de tratamentos onde se utilizou o inoculante LT proporcionou plantas com maior massa seca de parte aérea, assim como maior teor de N (Tabela 7). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos no contraste C4, o que os diferenciou foi apenas o TIS 1. Como já mencionado, estes resultados podem ter sido influenciados pelas altas temperaturas e baixas precipitações no período pós-semeadura (Figura 2). Estes fatores influenciaram diretamente na nodulação das plantas de soja.

No contraste C9 (Tabela 7) observa-se que as variáveis MNOD e TNPA foram influenciadas negativamente, quando a semente permaneceu armazenada por 10 dias. Como mencionado anteriormente, o fungicida fludioxonil pode ter interferido na nodulação das plantas, assim como o aporte de N para a parte aérea, conforme relatado por Alcântara Neto et al. (2014).

Analisando os resultados das safras 2013/14 e 2014/15 (Tabelas 6 e 7) é possível verificar que a utilização do TIS 2 permitiu a obtenção de maior TNPA das plantas de soja, ao passo que a inoculação em pré-semeadura por até 10 dias com o uso do inoculante LT proporcionou menor MSPA e menor TNPA, em comparação com a pré-inoculação por 5 dias. O uso do inoculante padrão proporcionou plantas com maior massa de nódulos, porém, menor MSPA.

Na Tabela 8 estão ilustrados os resultados da análise conjunta dos dois anos agrícolas para as variáveis número de nódulos (NNOD), número de vagens por planta (NVAG), teor de N na semente (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD). A análise do contraste C1 permite inferir que todos os tratamentos com aplicação de inoculante às sementes de soja, seja no momento da semeadura ou em pré-semeadura, bem como a aplicação isolada no solo de 200 kg de N ha<sup>-1</sup>, promoveram aumento em todas as variáveis resposta mencionadas anteriormente, em comparação com a testemunha, de maneira semelhante ao que ocorreu na análise isolada dos dois anos agrícolas (Tabelas 6 e 7).

No contraste C2, é possível verificar que as variáveis número de nódulos, produtividade e número de vagens por planta não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Como já explanado nesse trabalho, apesar da diferença não ter sido significativa, o uso da adubação nitrogenada possui várias limitações e seu custo-benefício não é superado pela FBN. Já para as variáveis TNS e MMS, os dados foram significativos, indicando que a inoculação das sementes, independente do tratamento empregado, supera a adubação nitrogenada na cultura. Isso se deve ao fato da adubação nitrogenada ter efeito adverso sobre a fixação biológica, devido à diminuição da disponibilidade de oxigênio na respiração nodular (DENINSON; HARTER, 1995) e a limitação de carboidratos ao metabolismo do nódulo (STEFENS; NEYRA, 1983). Estudos realizados por Stefens e Neyra (1983) indicaram que a adição de N as plantas de soja decresce a atividade da nitrogenase em mais de 50%. Isso ocorre porque o nitrato e o nitrito acumulados em nível nodular inibem a fixação de N, devido à diminuição da disponibilidade de energia ao bacterióide.

No contraste C3 da Tabela 8, observa-se efeito significativo dos tratamentos com o TIS 2 nas variáveis número de nódulos, número de vagens e teor de N na semente, superando aqueles em que foi empregado o TIS 1. Já que a diferença entre os tratamentos citados, sob efeito dos TIS 1 e TIS 2, são os produtos utilizados, é possível inferir que o TIS 1 promoveu decréscimo nessas variáveis. Como já citado, a mistura dos fungicidas carbendazim + thiram, nesse caso, pode ter reduzido o número de nódulos, que por sua vez influenciou no TNS. Sobre os inseticidas utilizados, Lamas et al. (2014) identificaram que fludioxonil + tiametoxam, independentemente da concentração utilizada, não prejudicou a nodulação. Em contrapartida, Dan et al. (2011) verificaram que os inseticidas imidacloprido + tiodicarbe, acefato e carbofuran reduziram o potencial fisiológico das sementes de soja.

**Tabela 8.** Resultados da análise conjunta dos contrastes ortogonais pelo teste F para número de nódulos (NNOD), número de vagens por planta (NVAG), teor de N na semente (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade (PROD), sob efeito dos diferentes tratamentos de inoculação e pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, nos anos agrícolas 2013/14 e 2014/15.

Contrastes	Estimativas dos contrastes				
	NNOD	NVAG	TNS	MMS	PROD
C1 Testemunha vs todos =	-143,62*	-232,42*	-13,87*	-98,53*	-7815,02*
C2 200 kg ha <sup>-1</sup> de N vs todos =	-97,04 <sup>ns</sup>	-62,96 <sup>ns</sup>	-8,96*	-21,98*	-2715,62 <sup>ns</sup>
C3 TIS 1 vs TIS 2 =	-29,78*	-25,67*	-0,63*	15,18 <sup>ns</sup>	93,75 <sup>ns</sup>
C4 Inoc. Padrão (TIS 1) vs Inoc. LT (TIS 1) =	-4,58*	-11,68 <sup>ns</sup>	-3,86 <sup>ns</sup>	13,98*	721,33*
C5 Inoc. LT 0 dia (TIS 1) vs 5 e 10 dias (TIS 1) =	-13,87 <sup>ns</sup>	1,76 <sup>ns</sup>	-3,58 <sup>ns</sup>	0,78 <sup>ns</sup>	250,84 <sup>ns</sup>
C6 Inoc. LT 5 dias (TIS 1) vs 10 dias (TIS 1) =	2,90*	-5,52 <sup>ns</sup>	0,10*	-0,12 <sup>ns</sup>	-296,50 <sup>ns</sup>
C7 Inoc. Padrão (TIS 2) vs Inoc. LT (TIS 2) =	-27,81*	-19,18 <sup>ns</sup>	-4,22 <sup>ns</sup>	8,65 <sup>ns</sup>	482,41 <sup>ns</sup>
C8 Inoc. LT 0 dia (TIS 2) vs 5 e 10 dias (TIS 2) =	-7,91*	-5,56 <sup>ns</sup>	1,83*	2,37 <sup>ns</sup>	-356,59 <sup>ns</sup>
C9 Inoc. LT 5 dias (TIS 2) vs 10 dias (TIS 2) =	17,45*	18,85 <sup>ns</sup>	2,53 <sup>ns</sup>	4,34 <sup>ns</sup>	-121,24 <sup>ns</sup>

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> não-significativo.

Ainda sobre o contraste C3, observando a produtividade e o componente de produção massa de mil sementes (Tabela 8), nota-se que, sobre eles, não houve efeito significativo do TIS 1 e TIS 2. Assim, é possível mencionar que, nesse caso, estes tratamentos não influenciaram negativamente o componente de rendimento massa de mil sementes, bem como a produtividade de grãos da soja. Entende-se, portanto, que apesar de ser um componente de rendimento, o número de vagens por planta interferiu em menor intensidade na produtividade, quando comparado à massa de mil sementes, já que o primeiro apresentou diferença entre os dois tratamentos industriais, ao passo que a produtividade não. Essa resposta também está relacionada ao fato de que existem outros componentes de rendimento que podem influenciar na produtividade das plantas, os quais podem também não ter sido significativos para esta comparação, bem como ao fato de que a massa de mil sementes também não foi significativa. Estes resultados corroboram com Conceição et al. (2014), que relatou que o tratamento químico com fungicida (Carbendazim + Thiram), inseticida (Imidacloprido + Tiodicarbe), micronutriente e polímero conferiram maior proteção às sementes e plântulas no campo, mas sem efeito significativo na produtividade. Tavares et al. (2014), estudando os inseticidas Fipronil, Tiametoxam e Imidacloprido no tratamento de sementes de soja, também com a cultivar BMX Potência RR, demonstram que não houve interferência desses produtos no desenvolvimento da cultura.

Os componentes de produção MMS e PROD, no C4 (Tabela 8), foram significativos; nesse caso, a inoculação com o inoculante padrão, utilizando o TIS 1, superou, em média, o grupo com os demais tratamentos com o inoculante LT. Entretanto, a utilização do inoculante LT proporcionou maior número de nódulos nas duas safras. Campo et al. (2009) avaliaram diferentes fungicidas na sobrevivência dos bradimirizóbios em sementes de soja e observaram reduções superiores a 60% no número de células, com uso dos fungicidas difenaconazole e carbendazim + thiram, após 2 e 24h da inoculação. Entretanto, após 48h da inoculação, a sobrevivência das bactérias diminuiu em todos os tratamentos, indicando que a semeadura deve ocorrer em até 24h após a inoculação. Outros resultados em que foi realizada a inoculação em pré-semeadura aumentou o efeito negativo do fungicida à base de carboxin + thiram sobre as bactérias inoculantes, mesmo esse fungicida tendo apresentado baixa toxicidade para as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080, quando a inoculação foi realizada no dia da semeadura (CAMPO, 2009; ZILLI, 2009).

No contraste C5, os componentes de produção NVAG, MMS, PROD, assim como NNOD e TNS, foram não significativos ( $P > 0,05$ ). Para estas variáveis, utilizando o

inoculante LT e o TIS 1, pode-se inferir que, nos dois anos agrícolas, não houve diferença entre se inocular as sementes no momento da semeadura ou até 10 dias antes.

O contraste C6, na análise conjunta (Tabela 8), para as variáveis número de nódulos e TNS foram significativas ( $P < 0,05$ ), sendo que os resultados da pré-inoculação de 5 dias foram superiores aos 10 dias. Como já mencionado, Campo e Hungria (2007) e Zilli et al. (2010) também demonstraram que a inoculação em pré-semeadura, 5 dias antes, foi eficaz. Estes autores também não evidenciaram diferenças nos resultados obtidos, quanto aos componentes de produção NVAG, MMS e PROD. Neste trabalho, ainda é possível afirmar que os componentes de produção não são afetados, quando as sementes inoculadas são armazenadas por até 10 dias.

A utilização do inoculante LT, proporcionou plantas com maior número de nódulos nas duas safras, como pode ser observado no contraste C7 (Tabela 8). Entretanto, para as demais variáveis não houve diferença significativa entre a utilização do inoculante padrão ou do LT.

Na Tabela 8, analisando o contraste C8, pode-se mencionar que o maior número de nódulos foi observado no grupo de tratamentos em que as sementes foram pré-inoculadas, ao passo que o teor de N na semente foi maior, quando as sementes receberam o inoculante no momento da semeadura. Nogueira (2012) também evidenciou, em vários ensaios conduzidos com soja, que houve uma baixa sobrevivência dos rizóbios nas sementes, quando a operação de tratamento das sementes foi realizada com antecedência. Como consequência, foi relatada uma baixa nodulação ou nodulação mais tardia. Isto evidencia que as bactérias conseguem colonizar as raízes da soja, porém, são capazes de fazê-la tardiamente, realizando a fixação biológica do N na planta durante um período menor e mais tardio. Entende-se, então, que o armazenamento de sementes tratadas com o TIS 1 por 5 ou 10 dias influencia no aporte de N às plantas de soja. Assim como no contraste C6, os componentes de produção se apresentaram não significativos.

No contraste C9, a variável NNOD (Tabela 8) foi significativa. Como já mencionado anteriormente o armazenamento das sementes por maior tempo pode diminuir o número de nódulos, bem como a sua massa. Quanto aos componentes de produção NVAG, MMS e PROD, estes foram não significativos. Pode-se mencionar, neste caso, que as sementes podem

ser inoculadas e armazenadas por até 10 dias, sem comprometer a produtividade e sem afetar o TNS.

Analisando os resultados da análise conjunta como um todo, é possível verificar que, independentemente do TIS empregado, as sementes inoculadas com o inoculante LT proporcionaram a obtenção de maior número de nódulos; contudo, quando estas são armazenadas por 10 dias houve uma redução significativa destes. Quanto aos componentes de rendimento, estes não se apresentaram significativos, quando foi utilizado o inoculante LT. Assim, é possível inferir que não há interferência na produtividade, na massa de mil sementes e no número de vagens, quando as sementes são inoculadas e armazenadas por até 10 dias. Porém, utilizando-se do inoculante padrão, juntamente com o TIS 1, a MMG e a PROD foram significativamente afetadas.

#### **4.3 Considerações finais**

A adição de qualquer inoculante ou a aplicação de 200 kg ha<sup>-1</sup> de N incrementaram as variáveis estudadas, quando comparadas à testemunha. O incremento nas variáveis analisadas depende do produto utilizado no tratamento industrial das sementes e do tempo de armazenamento. Verificou-se que a utilização da adubação nitrogenada fez com que as plantas tivessem menor teor de N e massa seca na parte aérea e menor número de nódulos em ano com irregularidade e escassez das chuvas, aliada a temperaturas elevadas. Por sua vez, os tratamentos com fungicida, inseticida e inoculante mostraram-se viáveis, pois mantiveram em níveis aceitáveis o número e a massa de nódulos. Por fim, baseado em todos os tratamentos avaliados nesse trabalho e seus resultados, recomenda-se que a inoculação das sementes de soja seja realizada o mais próximo possível da semeadura, levando em consideração a combinação dos diferentes princípios ativos adicionados ao tratamento químico e deve ser realizada anualmente para manter um nível satisfatório de bactérias no solo.

## **5 CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- as sementes podem ser inoculadas e armazenadas por até 10 dias, com o inoculante LT e os produtos carbendazim e thiram + imidacloprido e tiodicarbe, sem ocorrer redução nos componentes de produtividade da soja avaliados;

- a utilização da adubação nitrogenada convencional compromete a massa de mil sementes e o teor de N na semente, entretanto sem afetar a produtividade da cultura, quando comparado aos tratamentos de inoculação e pré-inoculação.

## 6 REFERÊNCIAS

A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington, D.C. 20 ed, 2016.

ABRASEM – Associação Brasileira de Sementes e Mudas. **Anuário 2013**. Brasília, DF: Abrasem, 2013. 120 p.

ALCÂNTARA NETO, F.; PACHECO, L. P.; ARAÚJO A. S. F.; PETTER, F. A.; ALMEIDA, F. A.; ALBUQUERQUE, J. A. A. Tempo de contato e de combinações de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. **Revista Agroambiente On-line**, v. 8, n. 1, p. 149-154, 2014.

ANDRÉS, J. A.; CORREA, N. S.; ROSAS, S. B. Alfalfa and soybean seed and root exudates treated with thiram inhibit the expression of rhizobia nodulation genes. **International Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 1/2, p. 47-53, 1998a.

ANDRÉS J. A.; CORREA N. S.; ROSAS, S. B. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 141-145, 1998b.

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

ARAÚJO, F. F.; CARVALHO, F. G. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus Subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 2006.

- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. Experimentação Agrícola. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2008. 237 p.
- BARROS, R. G.; BARRIGOSI, J. A. F.; COSTA, J. L. S. Efeito do armazenamento na compatibilidade de fungicidas e inseticidas, associados ou não a um polímero no tratamento de sementes de feijão. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 459-465, 2005.
- BAUDET, L.; PESKE, F. Aumentando o desempenho das sementes. **Seed News**, v. 9, n. 5, p. 22-24, 2007.
- BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v. 66, p. 1027-1031, 1980.
- BIGATON, D. Fungicidas e micronutrientes aplicados em tratamento de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seus efeitos sobre a nodulação e a fixação biológica do N. 2005. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Dourados, MS.
- 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**, v. 4, n. 7, p. 667-671, 2005.
- BOUWMEESTER, R. J. B.; VLEK, P. L. G.; STUMPE, J. M. Effect of environmental factors on ammonia volatilization from an urea-fertilized soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, p. 376-381, 1985.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- BREMNER, J. M.; MULVANEY, R. L. Urease activity in soils. In: BURNS, R. G. (Ed.). **Soil enzymes**. London: Academic Press, 1978. p. 149-196.
- BROUGHTON, W. J.; ZHANG, F.; PERRET, X.; STAEBELIN, C. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 129-137, 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 de soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, p. 231-235, 2003.

BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 381-393, 1999.

BYRNES, B. H. Liquid fertilizers and nitrogen solutions. In: INTERNATIONAL FERTILIZER DEVELOPMENT CENTER. Fertilizer manual. **Alabama: Kluwer Academic**, 2000. p. 20-44.

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

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Compatibilidade de uso de inoculante e fungicidas no tratamento de sementes de soja. Londrina: Embrapa Soja, 2000. (Circular Técnica / Embrapa Soja, n. 26).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas na nodulação e fixação simbiótica do N<sub>2</sub>. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 8 p. (Embrapa Soja. Pesquisa em Andamento, 21).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 335-338, 2005.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. A Inoculação da Soja. Londrina: Embrapa- CNPSo, 2007. 28 p. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 17; EMBRAPA CPAC. Circular Técnica, 34).

CAMPOS, B. H. C. Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, 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**, v. 30, p. 69-76, 2006.

CAMPOS, B. 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 Ciências do Solo**, v. 25, p. 583-592, 2001.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2014. Brasília, DF: Conab, 2014.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sexto levantamento, Março, 2015. Brasília, 2015. 28 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_03\\_11\\_14\\_07\\_48\\_boletim\\_graos\\_marco\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_03_11_14_07_48_boletim_graos_marco_2015.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2015.

CONCEIÇÃO, G. M.; BARBIERI, A. P. P.; LÚCIO, A. D.; MARTIN, T. N.; MERTZ, L. M.; MATTIONI, N. M.; LORENTZ, L. H. Desempenho de plântulas e produtividade de soja submetida a diferentes tratamentos químicos nas sementes. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1711-1720, 2014.

CRISPINO, C. C.; FRANCHINI, J. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLE, R. N. R.; LOUREIRO, M. F.; SANTOS, E. N.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Adubação nitrogenada na cultura de soja. Londrina. Embrapa Soja: 2001. 6 p. (Comunicado Técnico, 75).

CURLEY, R. L.; BURTON, J. C. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. **Agronomy Journal**, v. 67, p. 807- 808, 1975.

DAN, L. G. M.; DAN, H. A.; BRACCINI, A. L.; ALBRECHT, L. P.; RICCI, T. T.; PICCININ, G. G. Desempenho de sementes de soja tratadas com inseticidas e submetidas a diferentes períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 2, p. 215-222, 2011.

DAN, L. G. M.; BRACCINI, A. L.; BARROSO, A. L. L.; DAN, H. A.; PICCININ, G. G.; VORONIAK, J. M. Physiological potential of soybean seeds treated with thiamethoxam and submitted to storage. **Agricultural Sciences**, v. 4, n. 11A, p. 19-25, 2013.

DATE, R.A. Advances in inoculant technology: a brief review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 321-325, 2001.

DAVIDSON, B. R.; DAVIDSON, H. F. Legumes: The Australian Experience. **Somerset: Research Studies Press**, 1993.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1275-1288, 2004.

- DENISON, R. F.; HARTER, B. L. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. Nodule oximetry and computer modeling. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1355–1364, 1995.
- DHINGRA, O. D.; ACUÑA, R. S. Patologia de semente de soja. Viçosa: Editora UFV, 1997. 119 p.
- EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2013 e 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 264 p. (Sistemas de Produção, 15).
- EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja: Paraná – 2005. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224 p. (Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n. 5).
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006.
- FAGAN, E.B. Fisiologia da Fixação Biológica do N em Soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; GURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development description for soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. São Carlos. UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FOSSATI, M. L. Influências do tratamento de sementes de soja com inoculante, micronutrientes e fungicidas sobre a população inicial de plantas, nodulação, qualidade de sementes e rendimento de grãos. 2004. 23 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, F. A.; LORINI, I. Adoção do tratamento industrial de sementes de soja no Brasil, safra 2014/15. Londrina: Embrapa Soja, 2015.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. **Madison: University of Wisconsin Press**, 1932.

GOLO, A. L. KAPPES, C.; CARVALHO, M. A. C.; YAMASHITA, O. M.; Qualidade das sementes de soja com a aplicação de diferentes doses de molibdênio e cobalto. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31 n.1, 2009.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H. Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: Fealq, 2002. 305 p.

GRAHAM, T. L. Flavonoid and flavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.

GUPTA, S. B.; RAWAT, A. K.; KHARE, A. K. Effect of pre and postinoculation seed treatment with fungicides on nodulation and grain yield of soybean. **Legume Research**, v. 11, n. 4, p. 167-172, 1988.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005.

HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LORINI, I. Importância do tratamento de sementes de soja com fungicidas na safra 2010/2011, ano de “La Niña”. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8 p. (Circular Técnica, 82).

HENNING, A. A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J. & WETZEL, M. M. V. S. (Ed.). Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES COPASEM, 1987. p. 441-453.

HENNING, A. A.; CATTELAN, A. J.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; COSTA, N. P. Tratamento e inoculação de semente de soja. Londrina: EMBRAPA CNPSo, 1994. 6 p. (Comunicado Técnico, 54).

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

HERRIDGE, D.; ROSE, I. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2, p. 229-248, 2000.

HERRIDGE, D. F. Inoculation technology for legumes. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. (Ed.). Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Dordrecht: Springer, 2008. p. 77-115.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina. Embrapa Soja, 2014.

HIRSCH M. A. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. **Archives Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 84, p. 1109-17, 2003.

HOLLIS, A. B. DNA: DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. **Journal of General Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 215-222, 1981.

HOLT, J. G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. **Baltimore: Williams & Wilkins**, 1994. p. 76-170.

HUNGRIA, M. A Pré-Inoculação com Bradyrhizobium e o Tratamento Industrial de sementes de soja. Informativo ABRATES, Londrina- PR v. 25, n. 2, 2015.

HUNGRIA, M. Fixação biológica do N em soja. Microrganismos de importância agrícola. Brasília: Embrapa, 1994. p. 9-90.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; NOGUEIRA, A. M. A pesquisa em Fixação Biológica do N na Embrapa Soja: passado, presente e perspectivas futuras. Anais da XVI RELARE : Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. Agosto de 2012. Londrina, PR. p. 54 – 59.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Como a soja pode produzir mais. Rev. Cultivar Grandes culturas - ed. 20 - 2000. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=345>>. Acesso: 30 set. 2014.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; CARVALHO, I. M. Fixação biológica do N na soja. Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Cerrados, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular técnica, 13).

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

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. (Ed.). Nitrogen Fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. **Dordrecht: Springer**, 2005. p. 25-42.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Tecnologia de co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: Resumos da XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - Londrina, PR, agosto de 2013.

IAPAR. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1987. 35 p.

INSTITUTE, S. SAS/STAT user's guide, version 6. **SAS institute Cary, NC**, 1990.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium Japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136-139, 1982.

KHALLEQ, B.; KLANTT, A. Effects of various fungicides and insecticides on emergence of three wheat cultivars. **Agronomy Journal**, v. 78, p. 967-970, 1986.

KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 7428-7432, 1987.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jorda (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 501-505, 1992.

LAMAS, C.; BATISTA FILHO, A.; CINTRA, E. R. R.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE L. G. Compatibilidade dos inseticidas tiametoxam e imidacloprid com *Bradyrhizobium*. **Bioikos**, v. 18, n. 1, p. 17-20, 2004.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KORNODÔRF, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p. 363-376, 2000.

MAGALHÃES, M. F. Desempenho das sementes de milho tratadas com inseticida, fungicida e nematocida durante o armazenamento. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013. 46 p.

MALAVOLTA, E. Manual de cagem e adubação das principais culturas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1987. 496 p.

MAPA. Ministério da Agricultura. Síntese da cultura da soja no Brasil 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 30 set. 2014.

MARKS, B. B.; BANGEL, E. V.; TEDESCO, V.; SILVA, S. L. C.; SILVIANE BARRA FERREIRA, S. B.; VARGAS, R.; SILVA, G. M. Avaliação da sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp. em sementes de soja tratadas com fungicidas, protetor celular e inoculante. **Revista Internacional de Ciências**, v. 3, n. 1, 2013.

MARTENSSON, A. M. Efectsof agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 435-445, 1992.

MENTEN, J. O. M. Tratamento químico de sementes. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 4. 1996, Gramado. Anais Campinas: Fundação Cargill, 1996. p. 3-23.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. Informativo ABRATES, v. 20, n. 3, p. 52-53, 2010.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006.729 p.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v. 7, p. 869-885, 1995.
- OLIVEIRA, L. J.; CRUZ, I. Efeito de diferentes inseticidas e dosagens na germinação de sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 759-785, 1986.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. E. Soil microbiology and biochemistry. **San Diego: Academic Press**, 1989.
- PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, G. E.; ROSA, M. C. M.; COSTA NETO, J. Tratamento fungicida via peliculização e inoculação de *Bradyrhizobium* em sementes de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 433-440, 2009.
- PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, J. A.; CALDEIRA, C. M.; BOTELHO, F. J. E. Efeito do tratamento das sementes de soja com fungicidas e período de armazenamento na resposta da planta inoculada com *Bradyrhizobium*. **Revista Agroambiente**, v. 4, n. 2, p. 62-66, 2010.
- PINTO, N. F. J. A. Tratamento de sementes. Sete Lagoas: EMBRAPA/ CNPMS, 1991.10 p.
- RAUN, W. R.; JOHNSON, G. V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. **Agronomy Journal**, v. 91, p. 357-363, 1999.
- RITCHIE, S.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. How a Soybean Plant Develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, Coop. Ext. Serv., 1982. 20 p.
- RUFINO, C. Inoculante Biagro NG: aplicação e uso no processo de fixação biológica do N. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=855](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=855)>. Acesso em: 06 out. 2015.
- SANTOS, P. F.; ANDRADE SILVA, R.; COSTA, A. A.; CANTELLI, D. A. V.; MARTINS, M. C. Efeito do tratamento de sementes na nodulação e crescimento inicial da cultura da soja. **Cultivando o Saber**, v. 6, n. 4, p. 96-108, 2013.
- SARASWATHI, U., JAYAPRAGASAM, M.; SULOCHANA, N. Effect of some pesticides on germinating soybean seeds. **Pestology**, v. 20, p. 10-15, 1996.

SILVA, M. T. B. Inseticidas na proteção de sementes e plantas. *Seed News*, v. 2, n. 5, p. 26-27, 1998.

SIMEPAR - Sistema Meteorológico do Paraná. Informe sobre o verão 2014-2015. Disponível em <[http://www.simepar.br/emtempo/arquivos/Informe\\_Verao\\_2014-2015.pdf](http://www.simepar.br/emtempo/arquivos/Informe_Verao_2014-2015.pdf)> Acesso em: 18 out. 2015.

SINCLAIR, J. B. Control of seedborne pathogens and diseases of soybean seeds and seedlings. **Pesticides Science**, v. 37, p. 15-19, 1993.

SINGH, J.; LODHA, P. C. Compatibility of chemical seed protectants with *Bradyrhizobium japonicum* and their effects on symbiotic nodulation in soybean. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 27, n.2, p. 148-151, 1997.

SMITH, D. L.; HUME, D. J. Comparison of assay methods for N<sub>2</sub> fixation utilizing white bean and soybean. **Canadian Journal Plant Science**, v. 67, p. 11-19, 1987.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Handbook for rhizobia. **New York: Springer-Verlag**, 1994. 470 p.

SOMMER, S. G.; SHJOERRING, J. K.; DENMEAD, O. T. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops. **Advances in Agronomy**, v. 82, p.557-622, 2004.

STACEY, M. G.; OSAWA, H.; PATEL, A.; GASSMANN, W.; STACEY, G. Expression analyses of Arabidopsis oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. **Planta**, v. 223, p. 291–305, 2006.

STANLEY, J. S. J.; BROWN, G. G.; VERMA, D. P. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 148-154, 1985.

STEPHENS, B. D.; NEYRA, C. A. Nitrate e nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology**, v. 71, n. 4, p. 731-735, 1983.

SUBRAMANIAN, S. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant Journal**, v. 48, p. 261-273, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Trad. SANTARÉM, E. R. et al., 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 719.

## 7 ANEXOS

**Tabela 9.** Resultados médios de número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA), número de vagens por planta (NVAG), teor de N nas sementes (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade de grãos (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, para a cultivar BMX Potência RR (Maringá/PR, UEM – 2013/2014).

TRAT	NNOD (unid. pl <sup>-1</sup> )	MNOD (mg pl <sup>-1</sup> )	MSPA (g pl <sup>-1</sup> )	TNPA (%)	NVAG (unid. pl <sup>-1</sup> )	TNS (%)	MMS (g)	PROD (kg ha <sup>-1</sup> )
1	13,70	52,70	8,29	4,01	41,28	6,82	80,21	1629,23
2	17,55	57,23	11,13	5,13	55,09	7,31	96,65	2687,10
3	23,58	158,32	13,86	4,82	56,85	7,42	109,66	3515,06
4	17,13	121,95	19,75	4,66	63,63	7,10	100,99	3131,52
5	24,40	155,76	13,34	4,57	49,73	7,39	101,25	2460,47
6	24,60	62,75	20,10	4,94	65,73	7,12	98,99	3073,62
7	26,10	148,34	17,95	5,26	63,50	7,54	101,98	3150,46
8	26,87	128,35	17,46	5,29	53,80	7,55	96,00	2587,61
9	39,48	207,68	11,56	4,87	44,80	7,26	92,62	2524,32
10	26,33	152,72	17,20	4,94	54,60	6,94	89,31	3209,69

**Tabela 10.** Resultados médios de número de nódulos (NNOD), massa de nódulos (MNOD), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de N na parte aérea (TNPA)), número de vagens por planta (NVAG), teor de N nas sementes (TNS), massa de mil sementes (MMS) e produtividade de grãos (PROD), sob efeito dos tratamentos de pré-inoculação nas sementes de soja tratadas industrialmente, para a cultivar BMX Potência RR (Maringá/PR, UEM – 2014/2015).

<b>TRAT</b>	<b>NNOD (unid. pl<sup>-1</sup>)</b>	<b>MNOD (mg pl<sup>-1</sup>)</b>	<b>MSPA (g pl<sup>-1</sup>)</b>	<b>TNPA (%)</b>	<b>NVAG (unid. pl<sup>-1</sup>)</b>	<b>TNS (%)</b>	<b>MMS (g)</b>	<b>PROD (kg ha<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	9,25	48,91	8,11	3,86	17,16	6,68	98,86	2909,76
<b>2</b>	15,75	55,40	10,08	4,93	41,00	7,28	99,44	2985,08
<b>3</b>	24,25	146,80	11,19	5,52	42,72	7,32	102,70	3220,13
<b>4</b>	24,50	167,85	11,51	5,87	44,91	7,83	102,58	3290,02
<b>5</b>	34,00	149,06	16,75	6,67	51,53	11,22	101,42	3413,72
<b>6</b>	28,00	78,50	15,60	6,36	46,56	11,30	103,92	3393,57
<b>7</b>	25,00	194,01	14,90	5,54	45,16	7,33	100,13	3418,40
<b>8</b>	37,50	131,25	19,50	6,71	63,94	11,36	101,92	3421,91
<b>9</b>	50,25	210,25	20,26	7,23	97,34	12,35	107,27	3720,56
<b>10</b>	28,50	121,04	18,23	6,42	49,84	7,61	101,90	3277,66