

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE SEMENTES



INTERAÇÃO ENTRE AGROQUÍMICOS E INOCULANTE
COM *Bradyrhizobiumjaponicum* NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTE
DE SOJA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Norimar D'Ávila Denardin

Pelotas, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE SEMENTES



INTERAÇÃO ENTRE AGROQUÍMICOS E INOCULANTE
COM *Bradyrhizobium japonicum* NA QUALIDADE FISIOLÓGICA
DE SEMENTE DE SOJA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Mestre em Ciência.

ORIENTADOR: Dr. Paulo Dejalma Zimmer

COORIENTADORA: Dr^a Andreia da Silva Almeida

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D391i Denardin, Norimar D'Ávila

Interação entre agroquímicos e inoculante com *Bradyrhizobium japonicum* na qualidade fisiológica de semente de soja e fixação biológica de nitrogênio. / Norimar D'Ávila Denardin ; Paulo Dejalma Zimmer, orientador ; Andreia da Silva Almeida, coorientadora. — Pelotas, 2014.
87 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Tratamento de semente. 2. Glycine max. 3. Infectividade. 4. Germinação. 5. Vigor. I. Zimmer, Paulo Dejalma, orient. II. Almeida, Andreia da Silva, coorient. III. Título.

CDD : 631.521

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora
Aprovada em:

Dra. Andréia Almeida

Eng^o Agr^o Geri Eduardo Meneghello,
Doutor

Prof.^a Maria Ângela André Tillmann,
Doutora

Prof. Adj. Paulo Dejalma Zimmer, Doutor
Orientador

*A minha família amada, pelo apoio constante e incondicional em todas as
minhas empreitadas.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante, amor e bondade, guiando meus passos, e por todas as bênçãos que tenho recebido durante minha vida.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pela oportunidade de novos conhecimentos, bem como pela concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer, pela confiança, pela paciência, pelo incentivo, pelo estímulo e, principalmente pelo caráter e profissionalismo.

Aos docentes do curso de Pós-graduação, por compartilharem suas experiências no período de estudo.

À Fundação Pró-Sementes de Apoio à Pesquisa, pela logística e organização.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia na Agricultura, Aline Nagel Ávila, Bruna Trindade, Cristiano Pauletto e Marília Gabriela Hoffmann, pelo apoio nas atividades de implementação dos experimentos.

À amiga Dra. Andréia da Silva Almeida, pelo suporte e incentivo.

RESUMO

DENARDIN, Norimar D'Ávila. **Interação entre agroquímicos e inoculante com *Bradyrhizobium japonicum* na qualidade fisiológica de semente de soja e fixação biológica de nitrogênio.** 2014. 89f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

No cenário mundial, a soja é uma das culturas de maior importância econômica e social, no Brasil, seu complexo produtivo é líder do agronegócio. As demandas por inovações tecnológicas, almejando ganhos sucessivos de rentabilidade, implicam em constantes investigações. Dentre estas, vem se destacando o tratamento de sementes, com produtos fitossanitários, fertilizantes, inoculantes portadores de rizóbios e protetores celulares. Este processo tem gerado incertezas relativas ao efeito dos agroquímicos sobre a qualidade fisiológica das sementes e a eficácia dos rizóbios na fixação biológica de nitrogênio. Objetivou-se avaliar o efeito do tratamento de sementes de soja, associando produtos fitossanitários a estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na germinação e no vigor das sementes, na sobrevivência de rizóbios aderidos às sementes ao longo de períodos de armazenamento e na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio. Para atender a estes objetivos, foram implementados três experimentos: efeito do tratamento de sementes na qualidade fisiológica de sementes; efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes; e efeito do tratamento de sementes na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio. Os três experimentos foram estruturados com 12 tratamentos de sementes e uma testemunha absoluta, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, à exceção do terceiro que teve cinco repetições. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação, no período de dezembro de 2013 a julho de 2014. No laboratório, em substrato de areia, procedeu-se: teste de germinação das sementes no tempo zero e aos 15 e 150 dias após tratamento das sementes; teste de vigor das sementes aos 150 dias após o tratamento das sementes; e concentração de unidades formadoras de colônias aderidas às sementes no tempo zero e aos 15 e 150 dias após tratamento das sementes. Na casa de vegetação, as sementes tratadas foram semeadas, no tempo zero, em vasos Leonard, avaliando-se, no florescimento pleno das plantas: massa de matéria seca da parte aérea das plantas; massa de matéria seca das raízes; massa de matéria seca dos nódulos; número de nódulos; e teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas. Os resultados obtidos denotam que o uso isolado e/ou combinado dos produtos fitossanitários testados, bem como suas associações ao inoculante e ao protetor celular empregados, produzem interações específicas, que impedem conclusões generalizadas.

Palavras chave: tratamento de semente, *Glycine max*. infectividade, germinação, vigor, protetor celular.

ABSTRACT

DENARDIN, N.D. **Interaction between agrochemicals and inoculant with *Bradyrhizobium japonicum* on physiological quality of soybean and biological nitrogen fixation.** 2014. 89f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

On the world stage, the soybean is one of the largest crops of economic and social importance and, in Brazil, its productive complex is the leader of agribusiness. Demands by technological innovations, aiming at successive gains in profitability, imply in constants investigations. Among these, stands out the treatment of seeds with phytosanitary products and fertilizers associated to inoculants and cellular protectors. This process has generated uncertainty concerning the effects of agrochemicals on physiological seed quality and effectiveness of rhizobia on biological fixation of nitrogen. The objective of this study was to evaluate the treatment effect of soybean seeds, involving phytosanitary products, of nature insecticide and fungicide, in mixtures or not, with strains of *Bradyrhizobium japonicum*, with and without protective cell phone, on germination and vigor of seeds, in the survival of rhizobia inoculated to seed over storage periods and on infectivity and efficiency of rhizobia on biological fixation of atmospheric nitrogen. To meet these goals, three experiments were implemented: effect of seed treatment on physiological quality of seeds; effect of seed treatment on survival of colony-forming units rhizobia inoculated on the seeds; and effect of seed treatment on infectivity and efficiency of rhizobia on biological fixation of nitrogen. The three experiments were structured with 12 treatments, involving seed treatment, and an absolute witness, in experimental design completely randomized with four replications, except for the third which had five replications. The experiments were conducted in the laboratory and in the greenhouse, in the period December 2013 to July 2014. In the lab, on sandy substrate, proceeded to: seed germination test in zero time, 15 and 150 days after seed treatment; seed vigor test at 150 days after the seed treatment; and concentration of colony forming units adhered to seeds in time zero and 15 and 150 days after seed treatment. In the greenhouse, the treated seeds were sown, in time zero, in Leonard vessels, evaluating, in the stage of full flowering of plants: dry matter mass of plants; dry matter mass of roots; dry matter mass of nodules; number of nodules; total nitrogen in aerial part of plants. The results obtained show that the use isolated and combined of the phytosanitary products tested, as well as their associations with the inoculant and the cellular protector used, generate specific interactions that prevent generalized conclusions.

Key words: seed treatment, infectivity, germination, vigor, cellular protector.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1	Correlação entre a massa de matéria seca de nódulos por planta e o teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes..	53
Figura 2	Correlação entre o número de nódulos por planta e a massa de matéria seca de nódulos em plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.	54
Figura 3	Relação entre a concentração de unidades formadoras de colônia por semente (UFC semente-1) e o teor de nitrogênio-total na parte aérea de plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.	56

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Descrição dos tratamentos aplicados às sementes do cultivar de soja BMX Apolo RR e que formaram os três experimentos deste estudo. 25
Tabela 2	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na emergência aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN) e de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, no tempo zero (dia da realização do tratamento das sementes).. 33
Tabela 3	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na emergência aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN) e de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, 15 dias após a realização do tratamento das sementes. 36
Tabela 4	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na germinação aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN), de sementes mortas (M) e de plântulas emergidas com baixo vigor (PBV), em teste realizado em areia, 150 dias após a realização do tratamento das sementes. 38
Tabela 5	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na emergência aos quinze dias após a semeadura (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN), de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, com envelhecimento acelerado das sementes, 150 dias após a realização do tratamento das sementes. . . 40
Tabela 6	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, no comprimento de raiz (CR) e na massa de matéria seca de raiz (MMSR) de plântulas germinadas, em teste realizado em areia, com envelhecimento precoce das sementes, 150 dias após a realização do tratamento das sementes. 43

Tabela 7	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na sobrevivência de bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , expressa em unidades formadoras de colônias por semente (UFC semente-1), em experimentos realizados no tempo zero, 15 e 35 dias após a realização do tratamento das sementes. . . .	45
Tabela 8	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, no número de nódulos e na massa de matéria seca de nódulos (MMSN), em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.	49
Tabela 9	Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, na massa de matéria seca da parte aérea da planta (MMSPA), na massa de matéria seca de raiz (MMSR), no comprimento de raiz (CR) e no teor de nitrogênio total (N-total) da parte aérea da planta, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.. . . .	51
Tabela10	Matriz de correlação linear Pearson, dos indicadores de infectividade e eficiência na fixação biológica de nitrogênio em experimento conduzido em vasos Leonard a partir de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , com e sem protetor celular, instalado no dia da realização do tratamento das sementes	55

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Fixação biológica do nitrogênio.....	5
2.2. Qualidade fisiológica de semente.....	13
2.3. Tratamento de sementes.....	16
2.4. Ação de produtos fitossanitários sobre <i>Bradyrhizobium</i> sp.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Instalação e condução dos experimentos.....	24
3.2. Tratamento de sementes.....	25
3.3. Experimento 1: Efeito do tratamento de sementes na qualidade fisiológica de sementes.....	27
3.4. Experimento 2: Efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes.....	29
3.5. Experimento 3: Efeito do tratamento de sementes na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento de sementes na qualidade fisiológica de sementes.....	32
4.2. Experimento 2: Efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes.....	44
4.3. Experimento 3: Efeito do tratamento de sementes na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio.....	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial, a soja [*Glycinemax* (L.) Merrill] é uma das culturas de maior importância econômica e social. Na safra agrícola 2012/2013, foi cultivada em 108,7 milhões de hectares e produziu 267,9 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2014).

No Brasil, seu complexo produtivo vem liderando as exportações pertinentes ao agronegócio. A área cultivada situa-se em torno de 29,4 milhões de hectares, orendimento em cerca de 2.940kg ha⁻¹ e a produção atingiu, na safra agrícola de 2012/2013, 86,6 milhões de toneladas, destacando o País como o segundo maior produtor do mundo, atrás apenas dos EUA (CONAB, 2014).

As demandas e inovações tecnológicas para o cultivo da soja, objetivando aumentos sucessivos de rendimento, implicam em constantes investigações. Dentre estas demandas e inovações tecnológicas, destaca-se o suprimento de nitrogênio, via fixação biológica, diante da interação entre o complexo de insumos químicos envolvido no atual processo de tratamento de sementes e a inoculação de sementes com *Bradyrhizobium* sp.

Uma vez que a soja é uma das espécies cultivadas que mais se beneficia da fixação biológica de nitrogênio, dispensando inclusive o uso de adubações com nitrogênio de origem mineral, é indispensável elucidar os efeitos decorrentes do contato entre os insumos químicos envolvidos no tratamento de sementes e as bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas. De outra forma, a preocupação reside no quanto os insumos químicos, de natureza inseticida e fungicida, empregados no tratamento de sementes, afetam as bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico.

Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp., comumente chamadas de rizóbios, quando em contato com as raízes das plantas de soja, as infectam, formando nódulos. O sucesso desse processo simbiótico, que viabiliza e assegura a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, depende do estabelecimento da simbiose entre a planta e a bactéria, ação esta, resultante, dentre outros fatores, da qualidade do inoculante e de seu contato íntimo e seguro com a semente.

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é a mais econômica fonte de suprimento de nitrogênio para a cultura da soja. A fixação total de nitrogênio atmosférico pelo complexo soja-*Bradyrhizobium* tem sido estimada em 80 a 95% da demanda da cultura (HUNGRIA e CAMPO, 2006). Fontes alternativas de nitrogênio, para suprir essa necessidade da cultura de soja, na atualidade, são economicamente inviáveis. Portanto, o suprimento de nitrogênio para a cultura da soja depende da qualidade do inoculante. Nesse sentido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Instrução Normativa nº 13, de 24/03/2011) determina que formulações de inoculantes devam possuir eficiência agrônômica comprovada, com estirpes específicas e em concentração mínima que assegure 6×10^5 unidades formadoras de colônia por semente inoculada.

Com o intuito de aumentar o desempenho da cultura da soja, pela fixação biológica de nitrogênio atmosférico, a pesquisa tem disponibilizado tecnologias que contemplam, desde o lançamento de cultivares de elevado potencial genético, até a seleção de estirpes de rizóbios competitivos e altamente eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico. Medidas como uso de sementes certificadas, manejo adequado de solo, manejo de insetos praga e doenças, rotação de culturas etc., associadas ao emprego de inoculantes de qualidade comprovada, têm demonstrado ganhos de rendimento da ordem 4 a 8%, mesmo em solos com população de rizóbios já estabelecida e em anos agrícolas climaticamente desfavoráveis à cultura (HUNGRIA e BOHRER, 2000; DENARDIN, 2005). A ação conjugada desses fatores tem proporcionado aumento expressivo no rendimento de grãos de soja, chegando já a 6.000 kg ha^{-1} , com potencial para atingir 8.000 kg ha^{-1} (HUNGRIA e CAMPO, 2000; DENARDIN, 2006).

Todavia, indicações técnicas para a cultura da soja, objetivando prevenir danos provocados por insetos praga e doenças, no período que decorre entre a semeadura e o pleno estabelecimento da cultura, têm preconizado o tratamento de sementes com insumos químicos de natureza inseticida e fungicida associados a inoculantes com rizóbios. Esse procedimento tem gerado questionamentos referentes à ação dos agroquímicos na sobrevivência das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Nesse contexto, estudos de interação entre agroquímicos e fixação biológica de nitrogênio atmosférico têm-se mostrado efetivos e obrigatórios,

pois,além da preocupação com o controle de insetos praga e doenças, as tecnologias que objetivam elevar o rendimento da cultura devem, sobretudo,preservar a qualidade ambiental, altamente beneficiada pelo processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a interação entre o complexo de defensivos agrícolas de natureza inseticida e fungicida e as bactérias*Bradyrhizobiumjaponicum*, com e sem protetor celular, envolvidos no tratamento de sementes de soja, quantificando-seda qualidade fisiológica das sementes, do número de unidades formadoras de colônia por semente e, da eficiência das células de *Bradyrhizobium japonicum* em formar nódulos e fixar nitrogênio atmosférico.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] contribui pelo seu valor socioeconômico, determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos, com grande expressão no mercado interno e externo. A soja é uma cultura típica do continente asiático, porém com inserção mundial na economia de muitos países. Dentre os principais produtores de soja destacam-se os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina, a China e a Índia.

A produção mundial, na safra 2012/2013, foi de 267,9 milhões de toneladas, ocupando 108,7 milhões de hectares. O Brasil é o segundo maior produtor, destacando-se no ranking dos produtores mundiais de soja com a produção de 86,6 milhões de toneladas, área cultivada de 29,3 milhões de hectares e produtividade média de 2.939 kg⁻¹ (CONAB, 2014).

A cultura da soja tem ainda grande capacidade para absorver novas tecnologias. Sabendo-se que, frequentemente é ameaçada por um grande espectro de doenças, que resultam em depreciação do produto, redução de rendimento e perdas econômicas para o produtor, alguns produtos vêm sendo testados com o intuito de gerar melhor controle e enquadrar-se no rol das tecnologias limpas. Dentre as doenças e pragas destacam-se fungos, bactérias, vírus e nematoides, gerando problemas de grande impacto e relevância à sojicultura.

Sendo a soja uma cultura de importância como fator socioeconômico, pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de se alcançar maiores produtividades associando-as à redução de custos de produção. Nesse sentido, a ciência tem constantemente buscado novas cultivares de elevada produtividade, resistentes às pragas e doenças e adaptadas às mais diversas condições edafoclimáticas. Associado a estes esforços da ciência, destaca-se o papel dos produtos fitossanitários, na proteção das plantas ao ataque das diferentes pragas e doenças.

Modernos conceitos de controle de pragas e doenças têm sido empregados no sentido de minimizar os efeitos deletérios dos produtos fitossanitários ao meio ambiente e principalmente ao homem. O uso de produtos fitossanitários como inseticidas e fungicidas, tanto de natureza química como biológica, no tratamento de

sementes, constitui método eficiente para o controle de certas pragas e doenças. Contudo, deve-se conhecer a influência desses produtos na qualidade fisiológica das sementes, bem como, sua ação junto aos produtos biológicos, como por exemplo, as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, quando aplicados concomitantemente sobre as sementes. Estudos também devem ser realizados, com o intuito de desvendar o comportamento destas bactérias em pré-tratamento, como é o caso do tratamento industrial.

Sabendo-se que, a fixação biológica de nitrogênio é um dos fatores econômico de maior expressão na lavoura da soja e que, alguns produtos fitossanitários, tanto de natureza química como de natureza biológica, poderão afetar este processo, estudos devem ser conduzidos, objetivando avaliar o comportamento das bactérias na fixação do nitrogênio, bem como a capacidade dos rizóbios em sobreviver por longos períodos nas sementes tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

2.1. Fixação biológica do nitrogênio

O início de estudos com fixação biológica de nitrogênio, no Brasil, data da década de 1950. Resultados desses trabalhos proporcionaram ao país, apenas com a cultura da soja, economia da ordem de bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados. Uma das razões da competitividade da soja brasileira no mercado internacional está, fundamentada na independência do uso de fertilizantes nitrogenados, tecnologia que, associada a outros aspectos de manejo destacam o país como referência mundial na produção desta oleaginosa.

Além dos tratamentos culturais e dos insumos indispensáveis e requeridos pelas culturas, a demanda por nitrogênio, com ênfase para as espécies leguminosas, é um dos componentes críticos, tanto do ponto de vista quantitativo como econômico. A necessidade da cultura da soja, por exemplo, para produzir 1.000 kg ha⁻¹ de grãos é da ordem de 80 kg ha⁻¹ de nitrogênio e, para produzir 3.000 kg ha⁻¹ de grãos são necessários 240 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Esta demanda é suprida a partir de diferentes fontes de nitrogênio como: nitrogênio disponível no solo, a partir da decomposição da matéria orgânica, descargas elétricas, combustão e vulcões, fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio atmosférico (HUNGRIA e CAMPO, 2000).

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é a principal e a mais econômica fonte de nitrogênio para a cultura da soja, a qual resulta da relação estabelecida entre a planta e a bactéria fixadora de nitrogênio. A fixação total de nitrogênio pelo complexo soja-*Bradyrhizobium* tem sido estimada em 80 a 95% da demanda desta cultura (HUNGRIA e CAMPO, 2006). Fontes alternativas de nitrogênio para suprir a necessidade da cultura de soja são economicamente inviáveis no contexto atual.

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, comumente chamadas de rizóbios, quando em contato com as raízes de plantas leguminosas (fabaceae) às infectam formando nódulos. Essas bactérias não fixam nitrogênio de modo independente, sendo dependentes de um hospedeiro (planta) para estabelecer a simbiose. O sucesso da tecnologia de fixação biológica de nitrogênio atmosférico está associado ao adequado estabelecimento da simbiose entre a planta e a bactéria, ação esta, resultante, dentre outros fatores, de inoculantes de elevada qualidade e contato íntimo e seguro com a semente.

Com o intuito de aumentar o desempenho das culturas, pela fixação biológica de nitrogênio, como a da soja, a pesquisa tem colocado à disposição da agricultura, tecnologias que contemplam, desde o lançamento de variedades de elevado potencial genético, até a seleção de estirpes de rizóbios competitivas e altamente eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico. A ação conjunta desses fatores associada a novas formulações de inoculantes tem proporcionado aumento expressivo da produtividade de grãos dessa cultura, atingindo 6.000 kg ha^{-1} , com potencial para atingir 8.000 kg ha^{-1} (HUNGRIA e CAMPO, 2000).

A maximização do suprimento de nitrogênio em uma determinada cultura, como a soja, está na dependência da qualidade do inoculante empregado e da adoção de medidas que viabilizem interação eficiente entre a planta e a bactéria. Dentre essas medidas, destaca-se o uso de sementes certificadas, medidas de controle integrado de pragas e doenças, manejo de solo e, entre outras, rotação de culturas. Medidas dessa natureza, associadas à aplicação de inoculantes de qualidade assegurada e em solos com população de rizóbios já estabelecida, mesmo em anos agrícolas climaticamente desfavoráveis, tem mostrado ganhos de produtividade da ordem 4 a 8% (HUNGRIA e BOHRER, 2000).

A soja, por ser uma leguminosa exótica no Brasil e uma das poucas espécies que se associam com *Bradyrhizobium*, é pouco provável a ocorrência natural destas bactérias em solos brasileiros, havendo, entretanto, possibilidades de que algumas das estirpes introduzidas no solo juntamente com sementes ou através de inoculação artificial sobrevivam e se “naturalizem”. Ressalta-se que, devido a estresses ambientais ao período em que a cultura não se encontra disponível para a realização da simbiose, a população remanescente de células de rizóbios diminui no solo, e grande parte destas, perde, sensivelmente a capacidade de fixar, eficientemente o nitrogênio atmosférico.

As estirpes estabelecidas no solo competem por sítios de infecção nodular, dificultando a entrada dos rizóbios introduzidos pela reinoculação. A seleção que os rizóbios são submetidos pela pressão do ambiente, além de reduzir sua população, pode, sobretudo, colocar em risco sua estabilidade genética, devido à natureza biológica de uma célula bacteriana, ocorrendo seleção destas células com potencial de infectar raízes, porém, com menor grau de eficiência na fixação de nitrogênio.

As estirpes utilizadas nos inoculantes competem com as “naturalizadas” no solo, pois estarão junto às sementes no momento da emissão das primeiras raízes, multiplicando-se devido aos estímulos resultantes da rizosfera e, assim, elevando a produção de substâncias responsáveis pela efetivação da simbiose. Nesse contexto, infere-se que a reinoculação com inoculantes de qualidade se faz necessária, a cada safra, garantido nodulação e fixação biológica de nitrogênio eficiente.

Dentre as propriedades importantes em um inoculante, destacam-se: ser de fácil manipulação e aplicação e atender ao padrão requerido pela legislação vigente no país. Entre outras propriedades requeridas, é importante que o suporte/substrato/veículo proporcione proteção às células bacterianas quando estas estiverem em contato com produtos fitossanitários e/ou com outras substâncias que possam ser adicionadas às sementes e afetarem sua sobrevivência.

No Brasil, são utilizadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium* nos inoculantes, sendo duas de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 = CPAC 15 e SEMIA 5080 = CPAC 7) e duas de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019 = 29w). Estas estirpes são altamente eficientes na fixação de nitrogênio, proporcionando aporte de até 320 kg ha⁻¹ de nitrogênio à cultura da soja (HUNGRIA e CAMPO, 2000).

A inoculação de sementes, associada à aplicação de fungicidas, inseticidas e micronutrientes, é prática usual e pode afetar a sobrevivência dos rizóbios e, conseqüentemente, reduzir a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio (CAMPO e HUNGRIA, 2000). Porém, o tratamento de sementes com fungicidas, além de assegurar o estabelecimento da cultura, mediante o controle de patógenos transmitidos pela mesma, reduz e previne a introdução e disseminação destes na lavoura, pois condições desfavoráveis à germinação, como deficiência hídrica, retardam a germinação das sementes e a emergência das plântulas, expondo-as à ação de patógenos e de insetos-praga, que podem interferir no estande de plantas planejado, por deterioração das sementes ou morte de plântulas.

Muitos fungicidas proporcionam a morte de até 100% das células bacterianas inoculadas às sementes de soja, em apenas duas a três horas após à coaplicaçãodas combinações de fungicidas indicados para o tratamento de sementes, reduzindo a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio (CAMPO e HUNGRIA, 2000). A maior frequência de efeitos negativos do tratamento de sementes com fungicidas na fixação biológica de nitrogênio ocorre em solos de primeiro ano de cultivo com soja, com baixa população de *Bradyrhizobium*. Segundo Mendes et al. (2009), para garantir melhores resultados com a inoculação e o estabelecimento da população do *Bradyrhizobium* ao solo, o agricultor deve evitar o tratamento de sementes com fungicidas, desde que: 1) as sementes possuam alta qualidade fisiológica e sanitária, estejam livres de fitopatógenos importantes (pragas quarentenárias A2 ou pragas não quarentenárias regulamentadas) definidos e controlados pelo Certificado Fitossanitário de Origem (CFO) ou Certificado Fitossanitário de Origem Consolidado (CFOC), conforme legislação(Instrução Normativa nº 6 de 13 de março de 2000, publicada no D.O.U. no dia 05 de Abril de 2000); e 2) o solo apresente boa disponibilidade hídrica e temperatura adequada para rápida germinação e emergência. Caso essas condições não sejam atendidas, o produtor deve tratar a semente com fungicidas, preferindo as misturas Carboxin + Thiram, Difenconazole + Thiram, Carbendazin + Captan, Thiabendazole + Tolyfluanid ou Carbendazin + Thiram, que demonstraram ser os menos tóxicos para o *Bradyrhizobium*(CAMPO et al., 2009).

Denardin (2006) demonstra que certos princípios ativos, em condições de laboratório, casa de vegetação e campo, não afetaram a nodulação e nem a fixação

biológica de nitrogênio, em decorrência das características físico-químicas dos ingredientes empregados em algumas formulações desses agroquímicos.

Quando necessário o tratamento de semente com fungicidas e, sabendo-se que este poderá afetar a sobrevivência dos rizóbios, algumas medidas são indispensáveis para minimizar o efeito negativo do produto sobre as bactérias. Nesse sentido, as medidas mais eficazes são aumentar a dose do inoculante, garantindo maior número de bactérias viáveis junto à semente ou aplicar o inoculante no sulco de semeadura, evitando o contato direto das células bacterianas com o fungicida. É importante salientar que a aplicação do inoculante sempre deve ser após o tratamento fitossanitário da semente.

Tem sido comum a comercialização de sementes de soja pré-tratadas (AVELAR et al.; 2011). A tendência é, juntamente com o tratamento fitossanitário, agregar tecnologia a inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Porém, há ainda controvérsias em se utilizar o tratamento de sementes associado à inoculação com *Bradyrhizobium* manter as sementes tratadas por longos períodos de armazenagem. Trabalhos de pesquisa têm constatado quedas drásticas no número de células de *Bradyrhizobium* nas sementes, já a partir de 24 horas após a inoculação, tanto na presença de produtos fitossanitários quanto na presença de micronutrientes (HUNGRIA e CAMPO, 2000).

Dentre os produtos que afetam a viabilidade do *Bradyrhizobium* estão os micronutrientes, cobalto (Co) e molibdênio (Mo), moléculas estas indispensáveis à fixação biológica de nitrogênio. As indicações destes micronutrientes para a cultura da soja, aplicados às sementes, são de 2 a 3 g ha⁻¹ de Co e de 12 a 30 g ha⁻¹ de Mo. Na aplicação conjunta de fungicida e inoculante, haverá redução do número de nódulos e da eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Portanto, quando da utilização de produtos fitossanitários no tratamento de sementes, a alternativa é aplicar os micronutrientes por pulverização foliar, preferencialmente, nos estádios de desenvolvimento V3-V5 (CAMPO et al., 2009; CAMPO e HUNGRIA, 2000).

Inovações tecnológicas nas formulações de inoculantes surgem a cada safra. Entre as formulações comercializadas no país, a turfa, isoladamente ou em mistura com inoculantes líquidos, tem sido ainda muito utilizada, devido às propriedades

funcionais como veículo e como substrato, garantindo sobrevivência às células de rizóbios por maiores períodos de tempo.

As formulações líquidas têm grande aceitação pelos sojicultores, pois são de fácil manuseio, podendo ser aplicadas diretamente à semente, como ao solo, junto ao sulco de semeadura. Um dos desafios da pesquisa é a obtenção de formulação que aplicada às sementes garanta sua sobrevivência por períodos longos de armazenamento. Para que esses inoculantes possam garantir a sobrevivência das células de rizóbios, por longos períodos de armazenamento e também sob condições de estresse bióticos e abióticos junto às sementes ou ao solo, a indústria realiza estudos das condições físicas do veículo, na busca de produtos e aditivos protetores das células bacterianas. Estes produtos são chamados de protetores celulares, sendo comercializados com o intuito de favorecer também a pré-inoculação das sementes quando estas estão expostas a fungicidas, inseticidas ou ambos.

A forma de aplicação de um inoculante depende do tipo do inoculante. Os inoculantes turfosos devem ser aplicados de maneira a recobrir homogeneamente a semente, necessitando, portanto, de substâncias que promovam aderência à semente, as quais podem ser comercializadas separadamente dos inoculantes. O uso deste tipo de inoculante requer equipamento que promova espalhamento uniforme do inoculante sobre a semente e que não a danifique.

Os inoculantes granulados devem ser aplicados diretamente no sulco de semeadura. A aplicação deste tipo de inoculante poderá ser realizada colocando-se o mesmo no recipiente utilizado para a aplicação de inseticida granulado, que equipa a semeadora. Já os inoculantes líquidos ou géis podem ser aplicados, tanto sobre a semente, como diretamente no sulco de semeadura. Este tipo de formulação proporciona distribuição mais uniforme e apresenta capacidade de aderência mais efetiva. Sua aplicação no sulco de semeadura poderá ser realizada utilizando-se equipamentos desenvolvidos especificamente para esta finalidade.

Para elevar a concentração de células de rizóbios, junto à semente, e aumentar a sobrevivência destas no solo, várias são as alternativas tecnológicas disponíveis, que variam desde novas formulações até novas tecnologias de aplicação, que tem proporcionado além de maior eficácia ao processo de fixação biológica de nitrogênio, maior praticidade à inoculação.

O sucesso da fixação biológica de nitrogênio depende de vários fatores: qualidade do inoculante; tecnologia de aplicação; qualidade e genética da semente; e tratamentos culturais. Contudo, estudos relativos à tecnologia de aplicação podem determinar o sucesso da mesma, assegurando a presença das células de rizóbios junto à semente e, ou ao solo. Entende-se por tecnologia de aplicação o emprego de todo o conhecimento determinante da correta colocação de um determinado produto em um determinado alvo, em quantidade suficiente para que se alcance o objetivo proposto.

A tecnologia de aplicação de inoculantes vem sendo constantemente desenvolvida e aprimorada frente à crescente demanda oriunda da necessidade de compatibilizar inoculação e tratamento fitossanitário de sementes, com o intuito de resguardar a sobrevivência dos rizóbios.

Quanto maior for o número de células bacterianas junto à semente, no momento da germinação, maior a probabilidade de se obter adequada nodulação e, provavelmente, eficiente fixação biológica de nitrogênio. Falhas na distribuição do inoculante sobre a semente ou no sulco de semeadura podem limitar a atração quimioestática na infecção da planta pela bactéria introduzida.

No Brasil, várias formulações de inoculantes são comercializadas. Segundo indicação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), inoculante de qualidade deve apresentar concentração mínima de 1×10^9 células por grama ou mililitro de inoculante, para garantir uma população de 6×10^5 células de rizóbio por semente no ato da inoculação.

Fator de relevância em um inoculante é a pureza, ou seja, a presença exclusiva de células de rizóbios, garantindo, desta forma, a sobrevivência e a eficiência das células acondicionadas. Existem laboratórios credenciados que fazem análise de qualidade de inoculante e as análises oficiais são realizadas pelo Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio da Fundação de Pesquisa Agropecuária - Fepagro/MIRCEN (Microbial Resources Centres/UNESCO), em Porto Alegre, RS. Esta instituição também é responsável por fornecer às indústrias as cepas originais de rizóbios indicadas para a formulação dos inoculantes.

Os inoculantes são produtos que contêm bactérias vivas, portanto requerem cuidados de armazenagem e de aplicação. Indica-se que a semente deve ser semeada imediatamente após a inoculação, assegurando, desse modo, a concentração de

células inoculadas à semente. No momento da inoculação, faz-se necessário conhecer todos os fatores que determinam o sucesso dessa operação, bem como, o tipo de inoculante e a forma de aplicação dos mesmos e o local da aplicação, elegendo-se os que proporcionam o melhor custo/benefício. Os benefícios, tanto da inoculação como da reinoculação em áreas de cultivo com a cultura da soja são expressivos, desde que observadas as indicações técnicas abordadas.

Trabalhos de reinoculação em semente de soja, em solos com populações estabelecidas de *Bradyrhizobium*, realizados no Paraná, denotam aumento médio de produtividade da ordem de 8% (HUNGRIA e CAMPO, 2000; HUNGRIA e CAMPO, 2006). Experimento dessa mesma natureza, conduzido no Rio Grande do Sul, pela Universidade de Passo Fundo, em ano agrícola desfavorável, gerou ganho de produtividade superior a 4% e, em anos normais os dados igualaram-se aos encontrados por Hungria e Campo (2000), determinando que a reinoculação é benéfica, tanto em termos técnicos como econômicos.

A reinoculação de semente para semeadura em solos com população de *Bradyrhizobium* estabelecida garante, no momento da germinação, número de células que permite formação de nodulação abundante e eficiente junto à coroa da planta, favorecendo o estabelecimento da bactéria e a fixação biológica de nitrogênio, mais rapidamente.

Resultados de pesquisa em soja mostram que a aplicação de fertilizante nitrogenado na semeadura ou em cobertura, tanto em sistema plantio direto como em preparo convencional, reduz a nodulação e a eficiência da fixação biológica. Para a cultura da soja, a adubação nitrogenada, em substituição à inoculação, não promove incremento de produtividade e muito menos ganho em economicidade.

A introdução de estirpes de rizóbio altamente eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico pode não ser bem-sucedida, dado aos vários fatores já mencionados, dos quais se destaca a inabilidade das estirpes introduzidas competirem com a população de estirpes naturalizadas.

A magnitude da fixação biológica de nitrogênio é sem dúvida, exemplo de tecnologia de baixo custo com resultados extraordinários. A prática dessa tecnologia limpa coloca o Brasil em destaque.

Existem linhas de recomendação para aplicação de adubação nitrogenada. Porém, pesquisas realizadas obtiveram resultados de várias regiões onde a soja é cultivada. Os resultados destas pesquisas mostram que a aplicação de fertilizante nitrogenado na semeadura ou em cobertura em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, em sistema plantio direto ou preparo convencional, além de reduzir a nodulação e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, não traz nenhum incremento à produtividade da soja. No entanto, se as fórmulas de adubo que contêm nitrogênio forem mais econômicas do que as fórmulas sem nitrogênio, elas poderão ser utilizadas, desde que não sejam aplicados mais do que 20 kg ha⁻¹ de nitrogênio (MENDES et al., 2009).

Entretanto, ainda não há trabalhos que sejam conclusivos à adoção da aplicação do nitrogênio mineral em substituição à inoculação. Trabalhos realizados mostram que o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, quando aplicadas de acordo com o recomendado proporcionam suprimento de nitrogênio em suficiência à planta (MENDES et al., 2009). Num sistema agrícola, em que se procura reduzir os custos operacionais, sem comprometer a produtividade, e ao mesmo tempo assegurar agricultura limpa, a adoção de técnicas como a inoculação das sementes ou de outras tecnologias avançadas é fator determinante para a sustentabilidade do agronegócio.

2.2. Qualidade fisiológica de semente

A qualidade de semente é avaliada como padrão de excelência para certos atributos que determinam seu desempenho, tanto enquanto armazenada como quando semeada. Semente de qualidade subsidia a maximização da ação de insumos e fatores de produção empregados na lavoura (DENARDIN, 2010). Nesse sentido, à semente está reservado padrão genético, qualidade fisiológica e, principalmente, qualidade fitossanitária, que constitui um dos fatores de maior responsabilidade para o desempenho da cultura, desde a semeadura até a colheita.

A abertura de novas áreas para cultivo e os monocultivos contribuem, sobretudo, para a introdução e expansão de doenças. As perdas anuais de produtividade por doenças são expressivas para a maioria das culturas. Para certas espécies, algumas doenças podem ocasionar 100% de perda. A opção por semente de

qualidade, portanto, é imprescindível para o estabelecimento adequado da população de plantas no campo, o pleno desenvolvimento da cultura e a maximização da produtividade. Contudo, a semente ainda é considerada, por parte de produtores rurais, como componente secundário do sistema de produção. No Brasil, verifica-se, constantemente, descaso à qualidade deste insumo relevante à implementação da lavoura e ao agronegócio.

O controle de qualidade de semente é exercitado em todas as fases do processo de produção, com início na seleção do campo de produção e fim no estabelecimento da próxima lavoura. Portanto, a semente é um dos insumos agrícolas que detém o mais completo e rigoroso controle de qualidade, com processos regulamentados para disponibilizar o conhecimento oriundo deste controle ao usuário, mediante Atestado de Garantia de Semente, documento este que transcreve as informações oficiais das análises de qualidade da semente, atestando pureza física e varietal e a análise sanitária associada a testes fisiológicos como germinação e vigor, que podem esclarecer as causas do nível de qualidade da semente, além de orientar, com maior precisão, os tratamentos requeridos pela semente em pré-semeadura. Teste de emergência em escala de campo poderá compor esse quadro de parâmetros analíticos.

O vigor é um dos principais atributos da qualidade fisiológica das sementes o qual deveser considerado no momento da implantação de uma lavoura. Sementes que apresentem tal característica, certamente assegurarão o estabelecimento adequado das plantas, com estande mais uniforme e com maior resistência para enfrentar os estresses ambientais (MARCOS FILHO e KIKUTI, 2006; MARCOS FILHO, 1999; KRZYZANOWSKI, 1999). É possível que sementes que possuem vigor, mesmo com densidade menor de plantas, podem promover elevada produtividade (TEKRONY e EGLI, 1991).

Desse modo, vigor é um parâmetro que caracteriza o potencial fisiológico das sementes indicando lotes com maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura em campo ou durante o armazenamento (MARCOS FILHO e SHIOGA, 1981). Porém, sementes de baixa qualidade fisiológica podem ter reduções na taxa de emergência e estande desuniforme, fatores estes que podem influenciar no rendimento da cultura (SCHUCH et al., 1999), e que podem ser potencializados devido a fatores ambientais, desfavoráveis à germinação e ao desenvolvimento da plântula.

A qualidade da semente de soja pode ser influenciada por diversos fatores, os quais podem ocorrer antes e durante a colheita e em todas as demais etapas de produção. Dentre esses fatores, podem-se destacar os danos mecânicos, causados nas operações de colheita e beneficiamento, os danos causados por insetos como percevejos e a deterioração pelo efeito de variações climáticas extremas entre elevados teores de umidade e secas durante a maturação (FRANÇA NETO et al., 2000). Muitos são os fatores resultantes do estresse ambiental o qual modifica significativamente o metabolismo celular das sementes e, conseqüentemente diminuindo sua qualidade fisiológica, principalmente, o vigor e a germinação e, muitas vezes, oportunizando o aparecimento de sementes verdes (FRANÇA NETO et al., 2005). Entre os fatores que influenciam a qualidade fisiológica das sementes encontram-se os microrganismos e dentre estes aqueles capazes de deteriorar as sementes e os que podem ser transmitidos para a plântula e causar doenças.

Várias empresas produtoras de sementes estão adotando o tratamento de sementes antecipado ou pré-tratamento. Esse processo vem sendo intensificado, com o tratamento realizado no momento do ensaque ou da entrega das sementes ao produtor. Um dos riscos deste processo está relacionado ao possível efeito fitotóxico que pode acentuar, em decorrência do aumento do período de armazenamento das sementes tratadas. No entanto, são escassas as informações referentes à influência dos inseticidas e fungicidas e combinações destes sobre a germinação e o vigor das sementes de soja quanto sobre a influência destes na sobrevivência de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Portanto, o uso de defensivos no tratamento de sementes juntamente com sementes de alta qualidade e as outras práticas culturais, é de fundamental importância quando se almeja elevadas produtividades. Segundo Popiningis (1985), a qualidade da semente se reflete diretamente na cultura resultante, em que é observada uniformidade da população e maior produtividade. Entretanto, sementes com baixa qualidade fisiológica apresentam decréscimo na porcentagem de germinação, aumento do número de plântulas anormais e redução no vigor das sementes (SMIDERLE e CÍCERO, 1998).

2.3. Tratamento de sementes

O principal objetivo do tratamento de sementes é proteger as sementes, as plântulas e as plantas na fase inicial de seu desenvolvimento contra fitopatógenos e insetos-praga, de maneira a garantir uniformidade inicial do estande e manutenção desta para que a capacidade produtiva da lavoura seja alcançada. Assim, o tratamento de sementes encontra-se em desenvolvimento crescente e envolvendo a pesquisa na busca de tecnologias capazes de manter o desempenho das propriedades da semente de alto potencial genético e qualidade fisiológica. O tratamento de sementes torna-se cada vez mais importante no sistema produtivo atual, como no caso de cultivos de grande importância econômica, como exemplo, soja, milho, trigo dentre outras espécies. A escolha do produto a ser aplicado deve ser realizada após análise criteriosa das necessidades reais de aplicação e, fundamentalmente, do diagnóstico correto de modo que esse procedimento é razão direta do sucesso de produtividade (GODOY e CANTERI, 2004). O nível de eficiência de controle de doenças e ou de pragas depende da severidade da doença no momento da aplicação, eficácia e dosagem do fungicida, ser sistêmico ou não, equipamento de pulverização, volume da calda, tamanho das gotas, densidade de plantas que favorece a máxima cobertura pelo fungicida, estágio fenológico de desenvolvimento da cultura e ciclo das cultivares, condições climáticas no momento da aplicação, entre outros, bem como, da genética do cultivar.

As tecnologias para o tratamento de sementes têm buscado princípios ativos de maior espectro de controle, uso de menor quantidade de volume de calda, concentrações de dose ajustadas para o volume de sementes por área e juntamente com a dose do ingrediente ativo por sementes a ser gasto. Vários são os produtos utilizados no tratamento de sementes, dentre esses aqueles que melhoram a aderência e os que promovem melhor distribuição dos produtos agroquímicos. Tem-se ainda, os que melhoram a fluidez das sementes no momento da semeadura, os que reduzem o pó liberado pelos produtos químicos e ainda aqueles usados como identificador e polímeros ou coating que se aliam como melhoradores da qualidade do tratamento de sementes.

A semente é o principal insumo agrícola. Assim, assegurar sua qualidade para a formação e obtenção de lavouras de elevado potencial produtiva é primordial. A qualidade de sementes de soja é dependente de vários fatores, dentre os quais se podem

citar a genética, o local de produção, bem como, o manejo do solo e da cultura e, principalmente o manejo sanitário (MACHADO, 2000). Assim, o tratamento de sementes tem sido recomendado para o controle de patógenos associados às sementes como forma de proteção destas (MACHADO, 2000). Porém, a qualidade fisiológica das sementes pode variar em função do produto químico utilizado no tratamento, os quais podem proporcionar aumento ou diminuição, tanto da germinação quanto do vigor de sementes (PEREIRA et al., 2007; GIANASI et al., 2000).

A grande maioria das plantas cultivadas, como a soja, está sujeita ao ataque de várias espécies de patógenos e pragas. Dentre estes que podem estar associados às sementes, encontram-se fungos, bactérias, vírus e nematoides, dentre outros. Esses podem atacar as sementes, as raízes após a germinação e parte aérea das plântulas após a emergência, sendo este momento a fase mais crítica a danos e à morte de plantas (BAUDET e PESKE, 2007). Entre os danos causados por essas pragas têm-se as podridões de raízes, morte de plântulas, tombamento, necrose da haste, subdesenvolvimento, má formações, hipertrofias e outras (MACHADO, 1988).

Os patógenos podem estar no solo ou ainda estarem interna e externamente às sementes, e, por isso, a obtenção de sementes com alta qualidade sanitária e fisiológica tem sido exigida. Os danos causados por esses patógenos ampliam o interesse pelo tratamento químico de forma a diminuir a quantidade de inóculo associado às sementes (SARTORATO, 1996). Contudo, seu uso constitui, ainda, uma técnica que deve ser continuamente investigada sob vários aspectos: eficiência, especificidade, ação sobre microrganismos de controle biológico e indutores de resistência e promotores de crescimento.

Com intuito de evitar possíveis danos e perdas decorrentes das ações de microrganismos e de pragas do solo, uma das alternativas é o uso preventivo do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas (SILVA, 1998). Esta prática é amplamente adotada, permitindo que a planta esteja protegida, pelo menos, durante os primeiros dias até que possa se desenvolver e contribuir para obtenção do estande inicial (BAUDET e PESKE, 2007).

O tratamento de sementes com fungicidas ou inseticidas é uma importante ferramenta em sistemas integrados de produção. Segundo Machado (2000), o

tratamento químico controla com eficiência muitos fitopatógenos, não só da raiz, mas no solo e parte aérea.

Dentre os produtos agroquímicos empregados no tratamento de sementes, fungicidas e inseticidas, promotores de crescimento, indutores de resistência e, dentre estes vários produtos biológicos, formam um grupo de substâncias que estão disponíveis para a proteção de plantas. Assim, independentemente da cultura, a adoção de certas tecnologias é primordial quando se pretende implementar uma agricultura competitiva. Embora, a observância de componentes de natureza climática, aptidão agrícola das terras, fertilidade do solo, época de semeadura com especificidade para cada cultivar e/ou espécie e, entre outras, manejo fitossanitário, se destaca, como preceito para o sucesso da lavoura e a qualidade da semente. Neste contexto, nos últimos tempos, além da qualidade fisiológica e fitossanitária da semente, o tratamento de sementes vem incorporando um expressivo complexo de tecnologias de natureza fisiológica, fitossanitária, nutricional e mecânica, tornando-a um componente de produção de magnitude econômica decisiva para assegurar retorno aos investimentos requeridos.

2.4. Ação de produtos fitossanitários sobre *Bradyrhizobium* sp.

Apesar dos benefícios que o tratamento químico pode proporcionar às sementes, relação simbiótica entre planta e bactéria poderá ser afetada (ANNAPURNA, 2005; CAMPO et al., 2003; CAMPO e HYNIGRIA, 2000).

A compatibilidade de *Bradyrhizobium* sp. com produtos químicos indicados para o tratamento de semente é controversa, devido, ainda, a grande variação de metodologia de análise utilizada (LARSON, 2013). As avaliações devem ser mais precisas no sentido de se definir o número de células por semente ter relação direta com a quantidade de nitrogênio fixado. Entretanto, deve-se levar em conta o tipo de solo, a disponibilidade água e o cultivar.

Fungicidas aplicados via tratamento de sementes podem reduzir a concentração de moléculas de *Bradyrhizobium* sp. nas sementes, devido ao princípio ativo, ao pH e aos solventes utilizados nas formulações (ANNAPURNA, 2005), e também podem

reduzir o número e a massa de matéria seca de nódulos (ANDRÉS et al., 1998; BIKROL et al., 2005).

Larson(2013) avaliou o efeito de quatro fungicidas aplicados às sementes de soja sobre a compatibilidade destas com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, sendo estes Thiram ($0,6 \text{ gkg}^{-1}$ de semente), Captan ($0,8 \text{ gkg}^{-1}$ de semente), Carboxin ($1,1 \text{ g kg}^{-1}$ de semente) e PCNB ($0,9 \text{ gkg}^{-1}$ de semente). O autor avaliou a concentração de bactérias nas sementes e o número de nódulos formados nas plantas. Os resultados do estudo mostraram que *Bradyrhizobium japonicum* foi compatível com Thiram e Carboxin, mas não com PCNB e Captan. PCNB reduziu a sobrevivência da bactéria nas sementes e a nodulação na raiz principal. Já o Captan foi menos tóxico para os rizóbios que o PCNB, porém também reduziu o número de nódulos na raiz principal. Entretanto, o Carboxin teve pouco efeito sobre células de *Bradyrhizobium japonicum* formação de nódulos na raiz principal quando as sementes foram semeadas no prazo de quatro horas após a inoculação. Contudo, após 24 horas, embora a nodulação tenha decrescido, a concentração de células se manteve no nível considerado adequado para a satisfatória nodulação. O fungicida Thiram não teve efeito adverso sobre a viabilidade celular e nem sobre o número de nódulos na raiz principal, mesmo quando as sementes foram semeadas há 24 horas após o tratamento. Os resultados também indicam que a compatibilidade deve ser avaliada, quantitativamente em relação ao tempo e que, a capacidade nodulante das bactérias sobreviventes é o principal fator na determinação de compatibilidade (LARSON, 2013).

Bigaton (2005) relata que dependendo do fungicida aplicado às sementes não são observados efeitos sobre a nodulação. Igualmente, Bueno et al., (2003) e Gianase et al., (2000) mostram que tratamento de sementes com os fungicidas Captan, Benomil, Carboxim+Thiram, Thiabendazol, Thiabendazol+Thiram e Carbendazil+Thiram não foram capazes de reduzir a nodulação e tão pouco afetaram o crescimento de plantas provenientes destas sementes.

Trabalhos realizados por grupo de pesquisa no Brasil, utilizando Thiametoxan, inseticida sistêmico do grupo dos Neocotinóides e da família Nitroguanidina, constataram que este foi capaz de aumentar a massa de raiz, elevando sensivelmente o vigor de plantas de soja e de outras culturas (CATANEO et al., 2008; DENARDIN, 2008; CASTRO et al., 2008) e o fipronil (BARROS et al., 2005).

Tavares et al. (2007) avaliaram a aplicação de Thiametoxan em tratamento de sementes de soja, cultivar Monsoy, em doses crescentes (0, 50, 100, 200 e 300 mL do princípio ativo por 100 kg de semente), e verificaram que o produto teve efeito quadrático sobre a área foliar. Entretanto, Pereira (2010), também estudando este inseticida, não observou diferenças na massa foliar, tanto em aplicação em sementes quanto em aplicação foliar.

Vale ressaltar que, para a produção de inoculantes são recomendados o uso de pares de estirpes, sendo indicado o uso das combinações das estirpes SEMIA 5079 (CPAC 15) e SEMIA 5080 (CPAC 7) de *Bradyrhizobium japonicum* e das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii*. Sabe-se que estas estirpes possuem comportamentos genéticos e fisiológicos distintos e que frequentemente podem sofrer mutações devido as condições de preservação, mas principalmente devido ao manuseio (repique) de subcultivos, originando cepas com características distintas das originais. Assim, é possível que diferenças na interação destas bactérias, quando em simbiose, podem apresentar respostas variadas àquelas que possivelmente a cepa original apresentaria. Verifica-se então que, estas diferenças entre estirpes e/ou entre as espécies ou entre as prováveis variantes deste gênero são inteiramente possíveis. Deste modo, em alguns casos, poderiam os resultados gerados serem inconclusivos ou mesmo controversos, quando se analisa a interação entre produtos fitossanitários e a eficiência simbiótica em leguminosas, principalmente, na cultura da soja (KOZUSNY-ANDREANI, 1992; SATO, 1995; MULLEN e WOLLUN, 1989).

Cataneo et al. (2008) verificou, após tratamento de sementes com Thiametoxan, que houve aceleração da germinação, por ativar a peroxidase e induzir maior desenvolvimento do eixo embrionário, eliminando o efeito da salinidade e do alumínio e deficiência hídrica.

Denardin (2008), estudando o efeito do Thiametoxan sobre a fixação biológica de nitrogênio no cultivar de soja BRS Macota, verificou que o produto atuou como estimulante sinérgico, induzindo maior resposta às variáveis analisadas. Esta resposta foi mais expressiva quando utilizada as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Entretanto, a combinação das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 resultou em maior desempenho quando comparada aos outros tratamentos com e sem o inseticida

Thiametoxan. Porém, outros trabalhos mostram que este produto é fitotóxico e que a fitotoxicidade aumenta com o tempo de armazenamento (DAN et al., 2010).

O efeito do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas sobre a inoculação das sementes com *Bradyrhizobium* spp. mostra que muitos destes produtos afetam drasticamente as bactérias e outros afetam pouco ou nada. Alguns produtos têm mostrado, além da eficácia fitossanitária, potencial para serem utilizados como promotores de crescimento, sendo capazes de promover maior vigor às plantas, se constituindo em tecnologias que protegem a cultura e ainda oferecem aumento potencial de rendimento ao oferecer estímulos fisiológicos às culturas.

Assim, estudos devem ser conduzidos de forma a esclarecer tais relações, preterindo generalizações. Muitas moléculas utilizadas no passado, para veicular os princípios ativos, continham substâncias altamente tóxicas aos rizóbios, como solventes e corantes de ação bactericida.

Para assegurar a inoculação de sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp. é necessário que estas estejam presentes em número suficiente e viáveis no inoculante, de maneira que garantam, quando combinadas aos tratamentos químicos, a formação de nódulos, capazes de fixar a quantidade de nitrogênio atmosférico requerido pela planta. Pesquisas têm buscado moléculas biológicas e químicas com o intuito de não somente proteger as células bacterianas. Estas moléculas teriam a função de assegurar também, por maior tempo, as bactérias junto às sementes ao longo do tempo de armazenamento, eliminando a necessidade da semeadura imediata das sementes após a inoculação. Além dessas funções, a pesquisa tem se empenhado na busca de moléculas com funções duplas de proteger e promover maior interação entre a bactéria e a planta.

Dessa forma, o uso de polímeros no tratamento de sementes pode ser uma forma de proteção às células, durante a inoculação das bactérias, e também no tempo de sobrevivência destas células por longos períodos, entre o tratamento das sementes até a semeadura, bem como, de serem utilizados para fixação dos produtos empregados no tratamento das sementes, promovendo a minimização dos riscos de fitotoxidez (PIRES et al., 2004).

Para que a planta tenha eficiente nodulação depende, entre outros fatores, da manutenção do número mínimo de células viáveis da bactéria no inoculante, desde a

sua fabricação até o momento de uso (ANDRADE e HAMAKAWA, 1995; FERREIRA et al., 2011). Na maioria das lavouras de soja do país, o processo de inoculação das sementes ocorre no momento da semeadura, sendo, frequentemente, relatado 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 e HUNGRIA, 2003).

Esse problema parece estar sendo resolvido pelo Tratamento de Sementes Industrial (TSI), o qual surge como alternativa, assegurando o rendimento da lavoura, o número de plantas por área e maior uniformidade das plantas pelo controle de pragas e de doenças. Porém, como ainda é uma técnica emergente no Brasil, é importante que seja observado o comportamento das sementes diante destes e, ainda é necessária a observância de treinamento de técnicos capazes de operar com eficiência e precisão o equipamento usado para este fim. Pois, sendo estas estações de tratamento, capazes de operar com grandes volumes, a calibração é de fundamental importância, garantindo uniformidade e dosagens corretas dos produtos por unidade de semente. Faz-se necessário ainda, o monitoramento constante da lavoura e, caso necessário, a utilização de métodos auxiliares para o controle de doenças e pragas. Nesse caso, é de suma importância a utilização de sementes de excelente qualidade. O processo exige que todas as sementes, quando tratadas, sejam coloridas para distingui-las dos grãos não tratados, evitando com isso o uso indevido, como por exemplo, na alimentação humana ou animal.

Novas pesquisas indicam que é possível o tratamento antecipado das sementes, bem como o uso de inoculação antecipada. Avaliações durante três anos consecutivos indicaram ser possível a inoculação antecipada das sementes de soja em até cinco dias antes da semeadura (CAMPO e HUNGRIA, 2009). No entanto, a aplicação desta estratégia depende de vários fatores, especialmente da habilidade da bactéria sobreviver na semente, o que tem restringido o uso desta prática (DATE, 2001).

Com o aumento da área cultivada sob sistema plantio direto observam-se aumento na incidência de pragas, principalmente aquelas de solo, verificando-se maior utilização de inseticidas no tratamento de sementes. Contudo, é pertinente sementes de soja tratadas com produtos fitossanitários devem ser testadas para o potencial

fisiológico, bem como, sua interação com as bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* spp. nas sementes, além de sua eficiência no controle da praga-alvo. Pesquisas mostram que muitos inseticidas não afetam a qualidade das sementes. Contudo, dados de literatura mostram divergências entre os relatos.

Devido à grande oferta de produtos que surgem a todo o momento, com novos princípios ativos e, novas formulações, fazem-se necessárias investigações de maneira a gerar mais informações, principalmente, com relação às misturas e sua influência na qualidade fisiológica das sementes. Estudos de interação destes com produtos biológicos e até mesmo com diferentes cultivares é fundamental. Outro aspecto relevante são informações sobre tempo de armazenamento de sementes tratadas e tempo de sobrevivência de células de rizóbios, quando estes forem aplicados conjuntamente.

Segundo pesquisadores esses procedimentos ainda não estão plenamente estabelecidos, necessitando de observância, cautela, e conhecimento no momento da escolha do tratamento e, avaliações precisas das sementes após tratadas, pois ainda são escassos e muito controversos os resultados.

Os trabalhos que abordam a ação dos produtos fitossanitários aplicados às sementes ainda não estão plenamente estabelecidos, de modo que é necessária observância, cautela, e conhecimento no momento da escolha do tratamento, pois os aspectos fisiológicos das sementes e de seu armazenamento devem ser analisados com critério. A avaliação das células bactérias junto às sementes tratadas com fungicidas e/ou com inseticida ou a combinação destes no momento da inoculação ou quando armazenadas sobre a sobrevivência e, principalmente a eficiência de fixação biológica do nitrogênio, devem ser monitoradas, pois os dados na literatura ainda são controversos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a compatibilidade de produtos fitossanitários e suas combinações em tratamento de sementes sobre o potencial fisiológico das sementes, a sobrevivência de bactérias aderidas às sementes, bem como, sua ação sobre a fixação biológica do nitrogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalação e condução dos experimentos

O trabalho foi conduzido em etapas, envolvendo atividades em escala de laboratório e em casa de vegetação, no Centro de Biotecnologia na Agricultura, localizado no município de Coxilha, no estado do Rio Grande do Sul.

O estudo foi estruturado em três experimentos: 1) avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja tratadas com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, em diferentes tempos de armazenamento- realizado em laboratório; 2) quantificação do número de unidades formadoras de colônia de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, em diferentes tempos de armazenamento- realizado em laboratório; e 3) efeito do tratamento de sementes de soja com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na formação e na massa de matéria seca de nódulos, no comprimento e na massa de matéria seca de raízes e na massa de matéria seca e no teor de nitrogênio total na parte aérea das plantas- realizado em casa de vegetação e laboratório.

Os três experimentos foram formados por 13 tratamentos constituídos pelo tratamento de sementes de soja com diferentes produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e com um inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, acompanhado ou não por um protetor celular de rizóbios, em conformidade com o exposto na Tabela 1. A implementação dos ensaios partiu do tratamento de três quilos de sementes do cultivar de soja BMX Apolo RR, colhidas na safra agrícola 2012/2013, para cada um dos 13 tratamentos.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos aplicados às sementes do cultivar de soja BMX Apolo RR e que formaram os três experimentos deste estudo.

Tratamento	Agroquímico		Protetor celular		Inoculante	
	Produto ¹	Dose ²	Produto ¹	Dose ²	Produto ¹	Dose ²
T1 ³	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	HiCoat	950 mL	Cell Tech HC	300 mL
T3	-	-	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T4	Avicta 500 FS	100 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T5	Sedaxane	100 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T6	Cruiser 350 FS	200 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T7	Apron RFC	200 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane	100 mL 100 mL 100 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T9	Derosal Plus	200 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T10	Standak	200 mL	-	-	Cell Tech HC	300 mL
T11	Standak	200 mL	HiCoat	950 mL	Cell Tech HC	300 mL
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane	100 mL 100 mL 100 mL	HiCoat	950 mL	Cell Tech HC	300 mL
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane	100 mL 200 mL 100 mL 100 mL	HiCoat	950 mL	Cell Tech HC	300 mL

¹Nome comercial, nome técnico, concentração do princípio ativo e natureza de ação do produto: Apron RFC (Fludioxonil 25 g L⁻¹ + Metalaxil-M 37,5 g L⁻¹), fungicida; Avicta 500 FS (Abamectina 500 g L⁻¹), nematocida e inseticida; Cell Tech HC (SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com 3 x 10⁹ células viáveis por mL), inoculante biológico líquido para soja; Cruiser (Thiamethoxam 350 g L⁻¹), inseticida; Derosal Plus (Carbendazim 150 g L⁻¹ + Thiram 350 g L⁻¹), fungicida; HiCoat (polímeros Histich + S30 e turfa Adhere), protetor celular de rizóbio; Maxin XL (Fludioxonil 25 g L⁻¹ + Metalaxil-M 10 g L⁻¹), fungicida; Sedaxane (Carboxamida 980 g kg⁻¹), fungicida; Standak (Fipronil 250 g L⁻¹), inseticida (AGROFIT, 2004).

²Volume do produto comercial aplicado por 100 kg de semente.

³Testemunha absoluta.

3.2. Tratamento de sementes

Os tratamentos das sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, foram realizados em 30 de dezembro de 2013. Nesse dia, considerado tempo zero do estudo, tiveram início os três experimentos projetados.

O teor de água das sementes, antes do tratamento das mesmas, determinado pelo método da estufa a 105±3 °C, durante 24 horas (Brasil, 2009), era de 10,1%.

Os 39 kg de sementes de soja (3 kg por tratamento) foram tratados com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e inoculados com inoculante contendo estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA

5079 e SEMIA 5080) com e sem a adição de protetor celular, em conformidade com o exposto na Tabela 1, à exceção do tratamento T1, que constituiu a testemunha absoluta do estudo, sem qualquer aditivo às sementes.

O preparo das caldas dos produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, a serem aplicadas às sementes dos tratamentos T4 a T13, foi realizado em frascos de Becker, seguindo as indicações técnicas respectivas de cada fabricante. O cálculo das doses proporcionais dos produtos para 3 kg de sementes teve como base a dose produto comercial para 100 kg de sementes (Tabela 1). Essas caldas foram depositadas no fundo de 10 sacos plásticos, com capacidade para 6 L, um para cada tratamento, com o auxílio de seringas volumétricas e, imediatamente, espalhadas na parede interna do saco plástico (aproximadamente a uma altura de 15 cm). A seguir, 3 kg de sementes foram adicionados a cada um dos sacos plásticos, os quais foram inflados, fechados e agitados até o perfeito recobrimento das sementes com as respectivas caldas. Em sequência, os sacos plásticos foram abertos para a secagem do revestimento das sementes.

A calda correspondente ao protetor celular, em volume proporcional para 3 kg de sementes, foi igualmente preparada em um frasco Becker, a partir da mistura de 200 mL de água, 300 mL de Histich, 150 mL de S30 e 300 g de Adhere, indicada para 100 kg de sementes. Para os tratamentos T2, T11, T12 e T13, adicionou-se à calda o volume proporcional para 3 kg de sementes do inoculante Cell Tech HC, a partir da dose de 300 mL indicados para 100 kg de sementes, objetivando atingir, pelo menos, 6×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por semente, conforme preconiza o Ministério da Agricultura, Pecuários e Abastecimento (MAPA).

Tanto a calda contendo o protetor celular e o inoculante (T2, T11, T12 e T13) quanto apenas o inoculante (T3 a T10), foram depositadas no fundo de novos sacos plásticos, com capacidade para 6 L, com o auxílio de seringas volumétricas e, imediatamente, espalhadas na parede interna dos sacos plásticos. A seguir, foram transferidas para esses sacos as sementes previamente tratadas com os produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida. Em sequência, os sacos foram inflados, fechados e agitados até o pleno recobrimento das sementes com o inoculante e/ou inoculante mais protetor celular e, imediatamente abertos para a secagem do revestimento das sementes.

A aplicação do inoculante, com e sem o protetor celular, em momento posterior ao tratamento fitossanitário das sementes, seguiu a indicação dos fabricantes.

Concluída essa etapa, as sementes foram embaladas em sacos de papel pardo, utilizadas para a implementação dos três ensaios e, a seguir, armazenadas em temperatura ambiente.

3.3. Experimento 1: Efeito do tratamento de sementes na qualidade fisiológica de sementes

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes de soja foi implementada em experimento sob delineamento inteiramente casualizado, contemplando os 13 tratamentos descritos na Tabela 1, em quatro repetições constituídas por amostras de 50 sementes de cada tratamento, mediante testes, em areia, de emergência e de vigor, bem como determinação do comprimento radicular e da massa de matéria seca das plântulas normais germinadas.

Teste de emergência

Os testes foram realizados, exclusivamente em substrato areia, segundo as Recomendações de Análises de Sementes - RAS (Brasil, 2009), e em três momentos: semeadura no tempo zero (dia da realização do tratamento das sementes), e em 15 e 150 dias após o tratamento das sementes.

Os testes foram realizados em caixas plásticas transparentes, com tampa de fechamento hermético, medindo 41 cm de comprimento, 29 cm de largura e 15 cm de profundidade, tendo como substrato areia de textura média.

A areia foi umedecida com água destilada e esterilizada em autoclave à temperatura de 121 °C e à pressão de 1,0 atm, por 1h30min. Em sequência à esterilização, a areia foi colocada em estufa de ventilação forçada, mantida à temperatura de 105 °C, por 48 horas, para completa secagem. Após o resfriamento da areia, procedeu-se a semeadura dos respectivos tratamentos. As caixas foram fechadas e mantidas em câmara de crescimento a 25°C ± 3°C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações processadas constaram da contagem de plântulas emergidas, aos quatro dias após a semeadura, da contagem final de plântulas normais e anormais e de sementes mortas, aos 15 dias após a semeadura. Exclusivamente na avaliação processada aos 150 dias após o tratamento das sementes, no quinto dia após a semeadura procedeu-se também a contagem de plântulas emergidas. Os dados obtidos foram expressos em percentagem.

Envelhecimento acelerado

O teste foi realizado, exclusivamente, aos 150 dias após o tratamento das sementes, mediante a técnica de envelhecimento acelerado, descrita por McDonald Junior e Phaneendranath (1978).

O envelhecimento acelerado foi realizado em caixas tipo Gerbox, com tampa constituída de tela de malha de 2 mm, sobre a qual as sementes de soja foram distribuídas de modo a evitar sobreposição das mesmas, e com 40 mL de água destilada no fundo de cada caixa. Essas caixas foram colocadas em câmara própria para envelhecimento acelerado de sementes, e mantida à temperatura de 41 °C, por 48 horas. Após esse período, procedeu-se a semeadura das sementes em areia, seguindo as Regras para Análises de Sementes (RAS), descrita em Brasil (2009). Para tal, as sementes foram semeadas em caixas plásticas transparentes, com tampa de fechamento hermético, medindo 41 cm de comprimento, 29 cm de largura e 15 cm de profundidade, em conformidade com os procedimentos descritos no item “Teste de emergência”.

As avaliações processadas neste teste constaram da contagem de plântulas emergidas, aos cinco dias após a semeadura, e da contagem final de plântulas normais e anormais emergidas e de sementes mortas, aos 15 dias após a semeadura. Os dados obtidos foram expressos em percentagem.

Comprimento do sistema radicular e massa de matéria seca das plântulas

Após a contagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado aos 15 dias após a semeadura, avaliou-se o comprimento das raízes e a massa de matéria seca das plântulas normais.

Para a avaliação do comprimento das raízes, procedeu-se a medição do comprimento da raiz primária das plântulas normais. Para a avaliação da massa de matéria seca das plântulas normais emergidas, os cotilédones foram retirados e as plântulas foram lavadas para a retirada da areia aderida. A seguir foram acondicionadas em sacos de papel pardo e colocadas para secar em estufa de ventilação forçada, mantida à temperatura de 65 °C, por 48 horas. A pesagem do material foi realizada em balança de precisão de 0,0001 g.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância, e de análise fatorial, quando significativa, as médias foram separadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro. Para os procedimentos analíticos empregou-se o pacote computacional SASM-Agri, versão 8.0 (CANTERI et al., 2001).

3.4.Experimento 2: Efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônias de rizóbios inoculados às sementes

A avaliação do número de UFC de *Bradyrhizobium japonicum* aderidas às sementes de soja foi implementada em experimento sob delineamento inteiramente casualizado, contemplando os 13 tratamentos descritos na Tabela 1, em três repetições constituídas por amostras de 100 sementes de cada tratamento. O experimento foi realizado em três oportunidades: em 30/12/2013, tempo zero, ou seja, no dia da realização do tratamento das sementes, em 14/01/2014 e 03/02/2014, respectivamente aos 15 e 35 dias após o tratamento das sementes.

O método para a contagem das UFC por semente foi o de diluições seriadas e cultivo em meio de cultura Yeast Extract-Glycerol-Agar (YGA) modificado, proposto por Vincent (1970), contendo vermelho congo. As amostras de semente, de cada tratamento e de cada repetição, foram colocadas em frascos tipo diluição de leite, contendo, cada um deles, 100 mL de solução fisiológica, acrescida de Tween 20, a 0,01% de concentração. A seguir, procedeu-se a diluição seriada e a semeadura de 100 µL de cada diluição, em cinco placas, pela técnica “spread plate”, contendo meio de cultura YGA, (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982). Para espalhar a

suspensão de cada diluição nas placas, fez-se uso da alça de Drigalsky. Em sequência, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica e incubadas à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 12 dias, quando foi realizada a contagem das UFC.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados, transformados pelo log x (base 10) e submetidos à análise de variância, e quando significativa, as médias foram separadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Para os procedimentos analíticos empregou-se o pacote computacional SASM-Agri, versão 8.0 (CANTERI et al., 2001).

3.5.Experimento 3:Efeito do tratamento de sementes na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica denitrogênio

A avaliação da infectividade dos rizóbios e da eficiência destes na fixação biológica de nitrogênio nas plantas de soja foi implementado em experimento sob delineamento inteiramente casualizado, contemplando os 13 tratamentos descritos na Tabela 1, em cinco repetições. O experimento foi instalado em 30/12/2013, tempo zero, ou seja, no dia da realização do tratamento das sementes.

O experimento foi conduzido em vasos tipo Leonard modificado (VINCENT, 1970), preenchidos com substrato composto por vermiculita, areia de textura média e carvão finamente moído, na proporção de 3:2:1, respectivamente. Antes da semeadura, os vasos, já preenchidos com o substrato, foram umedecidos com água destilada, embalados em papel pardo e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C e à pressão de 1,0 atm, por 1h30min. Após a esterilização e o resfriamento do conjunto vaso + substrato, procedeu-se a semeadura, com cinco sementes por vaso.

Os vasos foram irrigados com solução nutritiva de McKnight (1949), isenta de nitrogênio, composta por K_2HPO_4 (2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2%) + NaCl (2%), CaHPO_4 (10%), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,4%) e pela solução de micronutrientes (2,86 g de H_3BO_3 ; 2,03 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; e 0,09 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, por litro), corrigindo-se o pH para 6,7 (VINCENT, 1970). A aplicação da solução nutritiva foi realizada alternando-se com água destilada deionizada e estéril.

Quando as plantas atingiram cerca de 3 a 4 cm, procedeu-se o desbaste, deixando-se três plantas por vaso. O experimento foi acompanhado diariamente, monitorando-se a ocorrência de doenças.

No florescimento pleno, estágio R2, as plantas foram colhidas, e a parte aérea separada das raízes e colocada para secar em estufa de ventilação forçada mantida à temperatura de 65 °C, até peso constante. A seguir, determinou-se a massa de matéria seca da parte aérea, o tecido vegetal foi moído e a análise de nitrogênio total foi realizada pelo método de digestão e titulação (Microkjedahl), descrito por Liao (1981).

As raízes foram lavadas com água para a retirada do substrato aderido. Em sequência, avaliou-se o comprimento da raiz principal e os nódulos foram destacados e contados. Após esses procedimentos, as raízes e os nódulos foram colocadas para secar em estufa de ventilação forçada mantida à temperatura de 65 °C, até peso constante, e a massa de matéria seca de nódulos e de raiz foi determinada por pesagem, em balança de precisão de 0,0001 g.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância, e quando significativa, as médias foram separadas pelo teste de Tukey, a 5% probabilidade de erro. Os dados referentes ao número de nódulos foram transformados pela raiz quadrada de “ $x + 0,5$ ”, antes de serem submetidos à análise de variância. Foram também empregados testes de regressão para algumas análises. Para os procedimentos analíticos empregou-se o pacote computacional SASM-Agri, versão 8.0 (CANTERI et al., 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento de sementes na qualidade fisiológica de sementes

No teste de emergência das sementes, relativo ao experimento realizado no tempo zero, ou seja, no dia da realização do tratamento das sementes, tanto na primeira contagem (Emergência), aos cinco dias após a semeadura, quanto na contagem final de plântulas emergidas (CFPE), aos 15 dias após a semeadura, denota-se que os diferentes tratamentos de semente, combinando ou não produtos fitossanitários, inoculante e protetor celular, reduziram a emergência das sementes e influenciaram na ocorrência de plântulas anormais (AN) e de sementes mortas (M) (Tabela 2).

O efeito dos tratamentos sobre a emergência foi mais pronunciado na primeira contagem (PCPE) que na contagem final (CFE). Na primeira contagem foram quatro os tratamentos que se diferenciaram da testemunha absoluta e propiciaram percentuais de germinação abaixo do padrão de 80% (T3 - Cell Tech HC; T7 - Apron RFC + Cell Tech HC; T10 - Standak + Cell Tech HC; e T13 - Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + Protetor celular + Cel Tech) e na contagem final foram apenas três (T7 - Apron RFC + Cell Tech HC; T9 - Derosal Plus + Cell Tech HC; e T10 - Standak + Cell Tech HC). Estes dados revelam que a causada redução da emergência das sementes na contagem final, resultante do T7, foi morte de sementes, e do T9 e T10, foram a presença de plântulas anormais e sementes mortas.

Em relação à emergência de plântulas anormais, o menor efeito foi observado nos tratamentos T2 (Inoculante + protetor celular) e T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante), que se diferenciaram dos demais (Tabela 2). Em contrapartida, a maior influência resultou dos tratamentos T5 (Sedaxane + inoculante), T9 (Derosal Plus + Cell Tech HC) e T10 (Standak + Cell Tech HC). Entretanto, destes, apenas o T5, ao não proporcionar morte de sementes, assegurou o percentual de germinação na

contagem final acima do padrão exigido para comercialização de sementes de soja no Brasil, o qual está atualmente entre 80 a 85%.

Tabela 2. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na emergência aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN) e de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, no tempo zero (dia da realização do tratamento das sementes).

Tratamento		Emergência	CFPE	AN	M
		----- % -----			
T1	Testemunha absoluta	87 a	86 ab	14 b	0g
T2	Inoculante + protetor celular	86 a	92 a	7c	1 f
T3	Inoculante	74 cd	82 bc	15 b	3 e
T4	Avicta 500 FS + Inoculante	82 ab	82 bc	13 b	5c
T5	Sedaxane + inoculante	86 a	83 abc	17 a	0 g
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	81ab	83abc	16b	1 f
T7	Apron RFC + inoculante	66 e	79 d	13b	8 b
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	83 a	84 abc	7c	9 a
T9	Derosal Plus + inoculante	81 ab	78cd	18a	4 d
T10	Standak + inoculante	72 de	76 cd	16 a	8 b
T11	Standak + inoculante + protetor celular	81 ab	83 abc	13 b	4d
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	82 ab	81 bc	14b	5c
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	76 bcd	83 bc	13b	4 d

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A ocorrência de sementes mortas foi superior à testemunha absoluta em todos os tratamentos aplicados às sementes, à exceção do T5 (Sedaxane + inoculante)(Tabela 2). O tratamento T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante), embora tenha mantido o percentual de germinação na contagem final acima do padrão exigido para comercialização de sementes de soja no Brasil entre 80 a 85% (BRASIL, 2009), distinguiu-se dos demais, ao proporcionar o maior percentual de sementes mortas. Em adição, enfatiza-se que os tratamentos T7 (Apron RFC + Cell Tech HC) e T10 (Standak + Cell Tech HC), que resultaram em percentuais de germinação das sementes na contagem final abaixo de 80%, foram os que, após o T8, proporcionaram o maior percentual de morte de sementes.

Estes resultados corroboram a percepção de Ceccon et al. (2004), de que, embora o emprego de alguns inseticidas e fungicidas, combinados ou não, no tratamento de sementes seja considerado um método eficiente para controlar pragas e doenças, podem afetar, consideravelmente a qualidade fisiológica das sementes.

Pesquisa realizada por Castro et al. (2008) demonstra que os tratamentos de semente do cultivar de soja BRS 184, com 125 g de Thiametoxan (Cruiser) por 100 kg de sementes, com 500 mL de bioestimulante (Stimulate) por 100 kg de sementes, com 150 mL de Imidacloprid (Gaucho) por 100 kg de sementes, e com 9,5 kg ha⁻¹ de Aldicarb (Temik), comparados à testemunha sem tratamento, levam à formação de raízes mais finas, não estimulando aumento no crescimento radicular das plantas, o que não caracterizaria efeito tônico. O produto Aldicarb, na dose empregada, prejudicou a germinação e o vigor das sementes de soja e o Thiametoxan, proporcionou menor percentagem de germinação e menor vigor das sementes.

Alguns produtos, em determinadas situações, podem ocasionar redução da germinação e da sobrevivência das sementes, devido ao efeito fitotóxico que apresentam (NASCIMENTO et al., 1996; OLIVEIRA e CRUZ, 1986). De acordo com Dan (2010), esse resultado com o produto fitossanitário Thiametoxan (Cruiser), na dose de 100 mL para 100 kg de sementes reduziu percentual de germinação das sementes em relação à testemunha, com sementes não tratadas. Entretanto, Tavares et al. (2005) verificaram não haver diferença de germinação e de vigor de sementes, quando utilizaram diferentes doses de Thiametoxan, no tratamento de sementes de soja. Já Barros et al. (2001) e Almeida et al. (2011), pesquisando a influência do Thiametoxan sobre a qualidade fisiológica de sementes de feijão e de arroz, observaram que a germinação foi reduzida em relação à testemunha, porém, para o arroz, houve aumento na massa de raiz. Barros et al. (2001), Cataneo (2008) e Denardin (2009) demonstraram que esse produto, na dose de 100 mL por 100 kg de sementes, não afeta a germinação de sementes de soja, ativa enzimas de defesa da planta e aumenta a massa de matéria seca da planta. Rosa et al. (2012), estudando o efeito do Thiametoxan em sementes de milho, concluíram que ao longo do armazenamento, o vigor das sementes tratadas foi influenciado negativamente, e que a qualidade fisiológica das sementes é dependente do híbrido.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os resultados obtidos por esses autores. O produto Thiametoxan, associado exclusivamente ao inoculante (T6 - Cruiser 350 FS+ inoculante), proporcionou germinação igual à testemunha absoluta, tanto na primeira contagem (emergência) quanto na contagem final (CFG). Porém, quando combinado a outros produtos (T13 - Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), propiciou germinação igual à testemunha absoluta apenas na contagem final. Deste modo, denota-se que o tratamento de sementes com Thiametoxan, associado apenas ao inoculante, não altera o potencial germinativo das sementes de soja no tempo zero de armazenamento.

No teste de emergência de plântulas, relativo ao experimento realizado aos 15 dias após a realização do tratamento das sementes, tanto na primeira avaliação aos quatro dias após a semeadura, quanto na contagem final de plântulas emergidas, aos 15 dias após a semeadura, denota-se que, à semelhança do teste realizado no tempo zero, os diferentes tratamentos de semente, combinando ou não produtos fitossanitários, inoculante e protetor celular, afetaram a emergência das sementes e influenciaram na ocorrência de plântulas anormais e de sementes mortas (Tabela 3).

O efeito dos tratamentos sobre a emergência foi mais pronunciado na primeira avaliação (emergência) que na contagem final (CFPE) não diferindo da testemunha. Na primeira avaliação foram cinco os tratamentos que se diferenciaram da testemunha absoluta e propiciaram percentuais de germinação abaixo do padrão mínimo de 80% (T3 - Inoculante; T7 - Apron RFC + inoculante; T10 - Standak + inoculante; T11 - Standak + inoculante + protetor celular; e T13 - Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular). Os tratamentos T5 (Sedaxane + inoculante) e T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) diferenciaram-se dos demais, inclusive da testemunha absoluta, mantendo os mais elevados percentuais de germinação das sementes do ensaio. Destaca-se que, na primeira contagem, tanto no teste realizado no tempo zero quanto no teste realizado aos 15 dias após o tratamento das sementes, os tratamentos T3, T7, T10 e T13 proporcionaram germinação abaixo dos demais. Entretanto, na emergência aos 15 dias (Tabela 3), nenhum tratamento proporcionou percentual de germinação de sementes inferior ao padrão de comercialização de sementes. Porém, o T2 (Inoculante + protetor celular), com comportamento igual aos tratamentos T3

(Inoculante) e T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), diferenciou-se dos demais, com 97% de germinação.

Tabela 3. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na emergência aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN) e de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, 15 dias após a realização do tratamento das sementes.

Tratamento		Emergência	CFPE	AN	M
		----- % -----			
T1	Testemunha absoluta	80 b	89 bcd	10 abc	1 a
T2	Inoculante + protetor celular	81 b	97 a	3 c	0 b
T3	Inoculante	78 c	94 ab	5 bc	1 a
T4	Avicta 500 FS + inoculante	80 b	90 bcd	9 abc	1 a
T5	Sedaxane + inoculante	85 a	89bcd	11 ab	0b
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	82 b	90 bcd	9 abc	1 a
T7	Apron RFC + inoculante	64 d	90 bcd	9 abc	1 a
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	80 b	90 bcd	9 abc	1 a
T9	Derosal Plus + inoculante	82 b	90 bcd	9abc	1a
T10	Standak + inoculante	74 c	92 bcd	7 abc	1 a
T11	Standak + inoculante + protetor celular	70 c	93 bcd	6 bc	1 a
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	85 a	94 ab	6 bc	0 b
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	74 c	87 d	12 a	1 a

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em referência às variáveis emergência de plântulas anormais (AN) e sementes mortas (M), observa-se que, aparentemente, a influência dos tratamentos foi menor aos 15 dias do que no tempo zero de avaliação (Tabelas 2 e 3). Aos 15 dias (Tabela 3), estas variáveis se apresentam em menor importância, em razão de, em nenhum tratamento, o percentual de emergência ter sido inferior ao padrão de comercialização da soja no país.

Silveira et al. (2001), tratando semente de soja com o inseticida-acaricida Fipronil, detectaram efeito fitotóxico às plântulas emergidas e perceberam que o efeito aumentou com o tempo de armazenamento.

Trabalho realizado por Sediya (2012), estudando o efeito do tratamento antecipado de sementes de soja, verificou redução no índice de germinação com o

aumento do tempo de armazenagem após o tratamento das sementes com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida. Entretanto, quando associou os produtos Carbendazim+ Thiram (Derosal Plus), polímero protetor celular (EnVigorTM) e inoculante, observou que houve aumento na germinação imediatamente após o tratamento das sementes. A autora relata que quando aplicou somente inoculante houve melhoria na germinação até duas semanas após a aplicação do inoculante e decréscimo na terceira semana. Em referência à aplicação do fungicida associado ao inoculante, houve aumento no índice de germinação com duas e três semanas após o tratamento. Estes resultados obtidos por Sediya (2012) corroboram o observado no presente trabalho em relação ao tratamento T9 (Derosal Plus + inoculante), que demonstrou aumento no percentual de germinação do tempo zero para 15 dias após o tratamento das sementes.

No teste de emergência, relativo ao experimento instalado aos 150 dias após a realização do tratamento das sementes, tanto na emergência aos quatro dias após a semeadura, quanto na avaliação final de plântulas normais (CFPE), aos 15 dias após a semeadura, denota-se que, à semelhança dos testes instalados no tempo zero e 15 dias após o tratamento das sementes, os diferentes tratamentos de semente, combinando ou não produtos fitossanitários, inoculante e protetor celular, afetaram a emergência e influenciaram na ocorrência de plântulas anormais e de sementes mortas (Tabela 4). Embora os dados revelem intensa diferenciação entre os tratamentos na primeira contagem de germinação, a exemplo do segundo teste, instalado aos 15 dias após o tratamento de sementes, todos os tratamentos, na contagem final de plântulas normais, obtiveram percentuais de germinação acima do padrão de 80% estipulado para a comercialização no Brasil (Instrução Normativa número 09, de 2 de junho de 2005). Entretanto, os tratamentos T2 (Inoculante + protetor celular) e T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) distinguiram-se dos demais, com percentuais de germinação acima de 95%.

Em relação à emergência de plântulas com baixo vigor (PBV), à emergência de plântulas anormais (NA) e à ocorrência de sementes mortas (M), os resultados gerados (Tabela 4), a exemplo da germinação avaliada na primeira contagem (emergência),

revelaram acentuadas diferenciações entre os tratamentos, porém sem efeitos danosos ao percentual de plântulas normais emergidas (CFPE).

Tabela 4. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na germinação aos quatro dias (Emergência) e aos 15 dias (Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE) após a semeadura e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN), de sementes mortas (M) e de plântulas emergidas com baixo vigor (PBV), em teste realizado em areia, 150 dias após a realização do tratamento das sementes.

Tratamento	Emergência	CFPE	AN	M	PBV
	----- % -----				
T1 Testemunha absoluta	77 e	91 c	6 c	3 f	11 c
T2 Inoculante + protetor celular	88 b	97 a	3 f	0 h	10 d
T3 Inoculante	85 c	94 b	2 g	4 e	6 g
T4 Avicta 500 FS + inoculante	76 e	90 c	8 a	2 g	11 c
T5 Sedaxane + inoculante	79 e	86 d	7 b	7 c	7 f
T6 Cruiser 350 FS + inoculante	83 d	89 c	7 b	4 e	14 b
T7 Apron RFC + inoculante	70 f	90 c	3 f	7 c	10 d
T8 Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	81 d	90 c	2 g	8 b	8 e
T9 Derosal Plus + inoculante	78 e	92 c	1 h	7 c	15 a
T10 Standak + inoculante	79 e	92 c	2 g	6 d	7 f
T11 Standak + inoculante + protetor celular	95 a	94 b	2 g	4 e	4 i
T12 Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	84 c	95 a	5 d	0 h	8 e
T13 Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	71 f	86 d	4 e	10 a	5 h

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Trabalhos realizados por Pereira et al. (2011) denotam que sementes de soja tratadas com Thiabendazole + Thiram e Carbendazim + Thiram proporcionaram índice de germinação superior ao das sementes não tratadas. Estudando o efeito do armazenamento de sementes de soja tratadas com os inseticidas Fipronil, Thiametoxan, Imidacloprid e Imidacloprid + Thiodicarb, Pereira et al. (2009) observaram redução no vigor das plântulas emergidas, porém todos os tratamentos mantiveram vigor acima de 80%, mesmo aos 45 dias após a aplicação dos agroquímicos.

Gianasi et al. (2000), avaliando o efeito do tratamento de sementes de soja com fungicidas, em escala de campo, obteve aumento, tanto na percentagem de germinação

de sementes quanto na emergência de plântulas. Estes autores atribuíram esses aumentos à provável inibição do desenvolvimento de patógenos associados às sementes.

Na atualidade, empresas produtoras de sementes têm adotado o pré-tratamento de sementes, que consiste em tratar as sementes com antecedência à entrega ao produtor, ou seja, o tratamento das sementes é efetuado antes do envaze/ensaque. Neste procedimento, o tratamento de sementes pode associar fungicidas, inseticidas, micronutrientes, biorreguladores e inoculantes. Segundo Zambolim (2005), o pré-tratamento de sementes é uma tecnologia de baixo custo e de menor impacto ambiental e com grande efeito no rendimento das culturas. Entretanto, este procedimento ainda não está plenamente estabelecido, requerendo observância, cautela, conhecimento e discernimento quanto à seleção e associação dos produtos a ser aplicado, bem como avaliação precisa quanto à eficiência e eficácia dos equipamentos empregados no processo e quanto à qualidade das sementes antes e após o tratamento, pois são escassos e controversos os resultados de pertinência até então gerados. Menten (1996) enfatiza que produtos aplicados isoladamente/ou combinados podem ser fitotóxicos e este efeito se acentuar com o armazenamento e influenciar na qualidade fisiológica das sementes.

Os dados gerados neste estudo subsidiam, em parte, a adoção do processo de pré-tratamento de sementes para algumas associações de produtos fitossanitários utilizados para este fim, pois é notório que a porcentagem de emergência (CFPE) foi melhor aos 15 e aos 150 dias após o tratamento das sementes do que quando a germinação foi realizada no tempo zero, ou seja, no dia do tratamento das sementes.

No teste de vigor, realizado aos 150 dias após o tratamento das sementes, (Tabela 5) denota-se que os diferentes tratamentos de semente, combinando ou não com os produtos fitossanitários, utilizados nos testes, inoculante e protetor celular, afetaram a germinação das sementes (CFPE) e influenciaram na ocorrência de plântulas anormais emergidas (AN), porém não afetaram a incidência de sementes mortas (M). Destaque é dado aos tratamentos T4 (Avicta 500 FS + inoculante), T6 (Cruiser 350 FS + inoculante), T7 (Apron RFC + inoculante), T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante), T10 (Standak + inoculante), T11 (Standak + inoculante + protetor celular), T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) por

diferirem dos demais, inclusive do T1(Testemunha absoluta), ao apresentarem os maiores percentuais de germinação(CFG), com média de 80%, que se enquadra no padrão preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Instrução Normativa número 09, de 2 de junho de 2005).

Tabela 5.Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na emergência aos quinze dias após a semeadura (Contagem Final de PlântulasEmergidas - CFPE) e nos percentuais de plântulas anormais emergidas (AN), de sementes mortas (M), em teste realizado em areia, com envelhecimento acelerado das sementes, 150 dias após a realização do tratamento das sementes.

Tratamento		CFPE	AN	M
		----- % -----		
T1	Testemunha absoluta	70 b	26 a	4
T2	Inoculante + protetor celular	73 b	25 a	2
T3	Inoculante	73 b	24 a	3
T4	Avicta 500 FS + inoculante	84 a	15 b	1
T5	Sedaxane + inoculante	70 b	25 a	5
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	80 a	17 b	3
T7	Apron RFC + inoculante	81 a	17 b	2
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	80 a	18 b	2
T9	Derosal Plus + inoculante	74 b	24 a	2
T10	Standak + inoculante	80 a	20 b	0
T11	Standak + inoculante + protetor celular	78 a	19 b	3
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	80 a	19 b	1
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	77 a	22 a	1

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra e na ausência de letras, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Sementes, tratadas ou não, quando armazenadas por longos períodos e submetidas a estresse de elevada temperatura e umidade, ou seja, ao envelhecimento acelerado, naturalmente apresentam redução no percentual de germinação e maior ocorrência tanto de plântulas anormais emergidas quanto de sementes mortas. Conforme Tekrony (1995), teste de germinação de sementes submetidas à envelhecimento acelerado tem por objetivo avaliar o potencial fisiológico de sementes de qualquer espécie. Este teste determina a capacidade da taxa de deterioração de sementes quando expostas à elevada temperatura e umidade relativa do ar, considerando o ambiente como fator preponderante na intensidade e taxa de deterioração da semente.

Na Tabela 5, os dados resultantes do teste de envelhecimento acelerado, com sementes armazenadas por 150 dias após o tratamento das sementes, evidenciam este efeito, demonstrando que o poder germinativo (CFG) foi menor e o percentual de plântulas anormais emergidas (NA) foi maior do que no teste, também realizado aos 150 dias após o tratamento das sementes, porém na ausência de acondicionamento das sementes ao estresse de envelhecimento acelerado (Tabela 4).

Comparando-se os tratamentos acima destacados, T4, T6, T7, T8, T10, T11, T12 e T13, com a testemunha absoluta (T1), pode-se inferir que estes tratamentos proporcionaram às sementes certa condição de proteção ao estresse promovido pelo envelhecimento precoce. Os dois únicos tratamentos, envolvendo produtos fitossanitários que não apresentaram esse comportamento foram os fungicidas Carboxamida e Carbendazim+ Thiram, que constituem os tratamentos T5 (Sedaxane + inoculante) e T9 (Derosal Plus + inoculante), respectivamente. Fessel et al. (2003), avaliando o tratamento de sementes de soja com Carbofuran, observaram redução no percentual de vigor das plântulas emergidas, equivalente a 0,57 pontos percentuais para cada dia de armazenamento.

Em estudo realizado por Sediya (2012), foi observado que, em estudo envolvendo a técnica do envelhecimento acelerado, o tratamento de sementes de soja com fungicida + inoculante produziu o melhor resultado quando comparado à testemunha absoluta, uma vez que, a partir de uma semana desde o tratamento das sementes, houve aumento do índice de germinação das sementes, atingindo, em média, 95% de germinação na terceira semana.

Oliveira e Cruz (1986), avaliando o tratamento de sementes de soja e milho com Acefato e Carbofuran, observaram que a germinação e o vigor foram reduzindo linearmente com o período de armazenamento, contudo o efeito do Acefato foi maior do que o do Carbofuran. São pertinentes as observâncias que se devem ter quando se escolhe o tratamento para sementes. Estes autores salientam que as combinações de produtos, as doses de cada produto e a própria qualidade da semente devem ser criteriosamente selecionados, pois podem resultar, por ocasião da implantação da cultura no campo, em falhas no estande de plantas e, conseqüentemente na redução do rendimento das culturas. Segundo Braguini (2005), alguns autores afirmam que produtos fitossanitários são capazes de deteriorar sementes, em razão da formação de

radicais livres e, conseqüentemente do estresse oxidativo. Sementes de baixa qualidade fisiológica se deterioram mais rapidamente do que aquelas com maior vigor (AOSA, 1983).

Bays et al. (2007) observaram que sementes de soja tratadas com a combinação de fungicidas Carbendazim + Thiram apresentaram percentagens elevadas de germinação quando submetidas ao processo de envelhecimento acelerado. Entretanto, Marcos Filho e Shioga (1981) não encontraram alteração no potencial fisiológico de sementes de soja tratadas com esta mesma associação de fungicidas. Esses resultados devem ser analisados com cautela, visto que o efeito dos fungicidas depende da presença de certos patógenos nas sementes. Além disso, tanto a temperatura como a umidade elevada inibe a manifestação de certos microrganismos colonizadores de sementes (SEDIYAMA, 2012).

Na avaliação do efeito dos tratamentos sobre o comprimento de raiz (CR) e da massa de matéria seca de raiz (MMSR) de plântulas de soja emergidas das sementes armazenadas por 150 dias após o recebimento dos diferentes tratamentos e submetidas ao envelhecimento acelerado, observa-se que o efeito dos tratamentos foi menos pronunciado no CR do que na MMSR (Tabela 6). Para o CR, o tratamento T11 (Standak + inoculante + protetor celular) foi o único que se diferenciou dos tratamentos T1 (Testemunha absoluta), T2 (Inoculante + protetor celular), T4 (Avicta 500 FS + inoculante) e T10 (Standak + inoculante), com o menor valor, sem, contudo diferenciar-se dos demais. Em relação à massa de matéria seca de raiz, os tratamentos T5 (Sedaxane + inoculante), T7 (Apron RFC + inoculante), T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante), T9 (Derosal Plus + inoculante), T10 (Standak + inoculante) e T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) não diferiram do T1 (Testemunha absoluta). Já os tratamentos T3 (Inoculante), T4 (Avicta 500 FS + inoculante) e T11 (Standak + inoculante + protetor celular), embora sem diferenciarem-se dos tratamentos T2 (Inoculante + protetor celular) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), foram os que apresentaram a menor massa de matéria seca de raiz (Tabela 6).

Para a massa de matéria seca de raiz (Tabela 6) também avaliada aos 150 dias pelo teste de envelhecimento acelerado e, colocadas para germinar em areia verifica-se que, os tratamentos T1 (Testemunha absoluta) T5 (Sedaxane + inoculante) e T10

(Standak + Inoculante) foram os tratamentos que apresentaram maior massa de matéria seca de raiz seguindo dos tratamentos T7 (Apron RFC + inoculante), T8 (Avicta + sedaxane + Maxin XL + inoculante), T9 (Derosal Plus + inoculante), e T12 (Avicta + sedaxane + Maxin XL + inoculante + protetor celular). Os tratamentos que apresentaram a menor massa de matéria seca de raiz foram os tratamentos T3 (Inoculante Cell Tech), (T4) Avicta + inoculante e T11 (Standak + inoculante + protetor celular) seguidos dos tratamentos T2 (inoculante + protetor celular), T6 (Cruiser + inoculante), e T13 (Cruiser + Avicta + Sedaxane + Maxin XL + inoculante + protetor celular). Mesmo não havendo diferenças significativas entre os tratamentos tanto para massa de matéria seca de raiz como para o comprimento de raiz houve uma tendência para alguns tratamentos os quais se apresentaram com menos massa seca e menor comprimento de raiz. Este fato ocorreu provavelmente devido as condições em que as sementes foram colocadas (EA) e aos tratamentos químicos que foram submetidos, seguidos do tempo de armazenamento.

Tabela 6. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apollo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, no comprimento de raiz (CR) e na massa de matéria seca de raiz (MMSR) de plântulas germinadas, em teste realizado em areia, com envelhecimento precoce das sementes, 150 dias após a realização do tratamento das sementes.

Tratamento		CR (cm)	MMSR (mg g ⁻¹)
T1	Testemunha absoluta	16,2 a	1,25 a
T2	Inoculante + protetor celular	16,1 a	1,14 cd
T3	Inoculante	15,2 ab	1,08 de
T4	Avicta 500 FS + inoculante	16,7 a	1,06 de
T5	Sedaxane + inoculante	14,9 ab	1,28 a
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	15,4 ab	1,15 bcd
T7	Apron RFC + inoculante	14,4 ab	1,21 abc
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante	15,0 ab	1,22 abc
T9	Derosal Plus + inoculante	15,0 ab	1,21 abc
T10	Standak + inoculante	17,0 a	1,29 a
T11	Standak + inoculante + protetor celular	11,0 b	1,03 e
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	15,5 ab	1,22 abc
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	13,0 ab	1,14 cd

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Infere-se dos resultados obtidos que o tratamento de sementes, com determinados produtos fitossanitários, pode afetar o comprimento de raiz, porém, mais efetivamente, a massa de matéria seca de raiz de plântulas de soja germinadas, em teste realizado em areia, com envelhecimento acelerado das sementes.

4.2.Experimento 2: Efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes

Os dados relativos à sobrevivência de rizóbios nas sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e com um inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, acompanhado ou não por um protetor celular de rizóbios, em testes realizados no tempo zero, ou seja, 3 horas após o tratamento das sementes, e há 15 e 35 dias após o tratamento das sementes, são observados na Tabela 7.

Nos três testes realizados, tanto o tempo de armazenagem quanto os tratamentos influenciaram na concentração de unidades formadoras de colônia por semente (UFC semente⁻¹) e todos os tratamentos diferiram do T1 (Testemunha absoluta), que apresentou zero UFC semente⁻¹.

De modo geral, a concentração de UFC semente⁻¹ foi reduzida à medida que aumentou o tempo de armazenagem, chegando a zero, aos 35 dias de armazenagem, nos tratamentos T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante) e T9 (Derosal Plus + inoculante). Nenhum tratamento manteve similaridade entre as concentrações de UFC semente⁻¹ observadas no teste realizado no tempo zero e aquelas observadas nos testes realizados aos 15 e 35 dias após o tratamento.

No teste realizado no tempo zero, há cerca de três horas após o tratamento das sementes, já foi possível observar o efeito de certos produtos aplicados às sementes sobre a concentração de UFC semente⁻¹. Neste sentido, embora se tenha observado diferenças entre os tratamentos, apenas os tratamentos T2 (Inoculante + protetor celular), T6 (Cruiser 350 FS + inoculante), T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin

XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) se equivaleram ao tratamento T3 (Inoculante) e satisfizeram a concentração mínima de 6×10^5 UFC semente⁻¹ preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuários e Abastecimento (MAPA). A partir dos 15 dias de armazenamento, todos os tratamentos se apresentaram com concentrações de UFC semente⁻¹ aquém do padrão mínimo apregoadado pelo MAPA. Nem mesmo os tratamentos T2 (Inoculante + protetor celular) e T3 (Inoculante), sem a presença de produtos fitossanitários, a concentração de UFC semente⁻¹ se manteve no limite mínimo de 6×10^5 UFC semente⁻¹, indicada pelo MAPA. Contudo, aos 15 e 35 dias de armazenamento, o T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), foi o único tratamento a se distinguir dos demais, mantendo as mais elevadas concentrações de UFC semente⁻¹, com destaque para o tempo de 15 dias de armazenagem, ao conservar a concentração de UFC semente⁻¹ ainda na ordem de grandeza de 10^5 (Tabela 7), porém abaixo do padrão preconizado pelo MAPA.

Tabela 7. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na sobrevivência de bactérias *Bradyrhizobium japonicum*, expressa em unidades formadoras de colônias por semente (UFC semente⁻¹), em experimentos realizados no tempo zero, 15 e 35 dias após a realização do tratamento das sementes.

Tratamento	Tempo após o tratamento das sementes						
	Tempo zero		15 dias		35 dias		
	----- UFC semente ⁻¹ -----						
T1	Testemunha absoluta	0d	A	0d	A	0f	A
T2	Inoculante + protetor celular	1,9 x 10 ⁶ a	A	9,9 x 10 ⁴ b	B	1,3 x 10 ³ cd	C
T3	Inoculante	4,4 x 10 ⁶ a	A	7,8 x 10 ³ c	B	4,7 x 10 ² de	C
T4	Avicta 500 FS + inoculante	1,6 x 10 ⁵ c	A	1,4 x 10 ³ c	B	6,0 x 10 ² de	C
T5	Sedaxane + inoculante	3,2 x 10 ⁵ bc	A	6,6 x 10 ² c	B	7,0 x 10 ² de	B
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	7,3 x 10 ⁵ b	A	1,5 x 10 ³ c	B	1,3 x 10 ² e	C
T7	Apron RFC + inoculante	2,8 x 10 ⁵ bc	A	4,5 x 10 ³ c	B	2,7 x 10 ³ b	B
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	3,4 x 10 ⁵ bc	A	2,6 x 10 ³ c	B	0f	C
T9	Derosal Plus + inoculante	1,7 x 10 ⁵ c	A	1,0 x 10 ² c	B	0f	C
T10	Standak + inoculante	2,2 x 10 ⁵ bc	A	6,3 x 10 ³ c	B	1,7 x 10 ² e	C
T11	Standak + inoculantet + protetor celular	2,1 x 10 ⁵ bc	A	4,7 x 10 ³ c	B	3,3 x 10 ² de	C
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetorcelular	1,6 x 10 ⁶ a	A	5,8 x 10 ³ c	B	1,9 x 10 ³ bc	B
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	1,5 x 10 ⁶ a	A	1,9 x 10 ⁵ a	B	7,7 x 10 ³ a	C

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma coluna, e pela mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O fato do tratamento T3 (Inoculante), a partir dos 15 dias de armazenamento, não manter a concentração de UFC semente⁻¹ na ordem de grandeza preconizada pelo MAPA, infere que o inoculante Cell Tech HC, nas condições impostas por este experimento não se coaduna com a tecnologia de inoculação em pré-tratamento de sementes e que a redução da concentração de UFC semente⁻¹ não decorreu, exclusivamente de interações dos rizóbios com os produtos fitossanitários. Porém, nos tratamentos T8 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante) e T9 (Derosal Plus + inoculante), nos quais as UFC foram erradicadas das sementes, parece evidente que houve interação entre os produtos envolvidos no tratamento das sementes e os rizóbios (Tabela 7).

Analisando-se apenas o teste realizado no tempo zero, pois nos demais as concentrações de UFC semente⁻¹ não satisfizeram a indicação do MAPA, o protetor celular Hicoat não se mostrou eficaz, para a finalidade proposta de preservar células de rizóbios, quando associado, exclusivamente ao inoculante (T3 - Inoculante versus T2 - Inoculante + protetor celular) e quando associado ao Standak (T10 - Standak + inoculante versus T11 - Standak + inoculante + protetor celular), pois nestes casos não interferiu na concentração das UFC semente⁻¹. Em contrapartida, foi eficaz quando associado à mistura Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante (T8 - Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante versus T12 - Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), ao proporcionar maior concentração de UFC semente⁻¹ (Tabela 7).

Vários são os trabalhos que demonstram redução na concentração de células de rizóbios por semente, quando expostos a produtos de natureza fitossanitária, como fungicidas e inseticidas. Trabalhos realizados por Campo et al. (2009), em teste de sobrevivência de *Bradyrhizobium* em sementes de soja, tratadas pelas combinações de Carbendazim + Tolyfluanid e Thiabendazole + Tolyfluanid, observaram mortalidade de até 62% das bactérias, no período de duas horas após o tratamento das sementes, evoluindo para 95% após 24 horas de armazenamento. Resultado completamente oposto foi relatado por Bueno et al. (2003), ao constatarem estímulo no crescimento de células de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079), em sementes de soja tratadas com o fungicida Thiabendazole + Thiram. Corroborando esta percepção, Costa et al. (2013), ao

estudar Carbendazim + Thiram, Carboxin + Thiram e Thiabendazole associados a inoculante no tratamento de sementes de soja, observaram que estes produtos fitossanitários promoveram acréscimo no número de unidades formadoras de colônias de rizóbios. Mercante (2007), também contrapondo os resultados obtidos por Campo et al. (2009), ao avaliar o tratamento de sementes de soja com Fluquinconazole, verificou que este fungicida não afetou a sobrevivência das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, após 48 horas do tratamento.

Marks et al. (2008), estudando a compatibilidade de quatro fungicidas comerciais, Protreat (Carbendazim 15% + Thiram 35%), Vitavax + Thiram (Carboxim 20% + Thiram 20%), Derosal Plus (Carbendazim 15% + Thiram 35%) e Maxim XL (Fludioxonil 2,5% + Metalaxyl-M 1%), combinados com inoculante comercial, contento as estirpes SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), com e sem protetor celular, no tratamento de sementes de soja do cultivar RS10, verificaram que o número de UFC sementes⁻¹ nos períodos de quatro, 24 e 48 horas após os tratamentos, diminuíram com o passar do tempo e que, no período de quatro horas, os melhores tratamentos foram a testemunha inoculada associada ou não com os produtos Protreat, Vitavax + Thiram e Maxim XL. Entretanto, os resultados obtidos, mesmo no período de quatro horas, não mantiveram a concentração mínima de UFC semente⁻¹ indicada pelo MAPA.

Graham et al. (1980) relatam que há incompatibilidade entre os fungicidas Thirame Capatan para *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*, quando o período de armazenamento, após a inoculação das sementes tratadas com estes fungicidas ultrapassa 24 horas. Silva Neto et al. (2013), trabalhando com formulações à base de Fludioxonil e de Carbendazim, verificaram redução no número de nódulos em feijão-caupi do cultivar BRS Guariba. Entretanto, os autores relatam que a nodulação, assim mesmo, foi suficiente para a nodulação, apresentando em média 15 nódulos por planta.

Considerando os resultados de pesquisa citados, denota-se que as conclusões são controversas. Há estudos demonstrando que produtos fitossanitários afetam a sobrevivência dos rizóbios e há estudos que demonstram haver estímulos ao crescimento de certas estirpes de *Bradyrhizobium*. Segundo Zilli et al. (2010a), estes efeitos dependem do momento da inoculação após o tratamento com fungicidas e da

estirpe de rizóbios utilizada. Contudo, a exemplo do ocorrido no presente estudo, a ação resultante sobre a sobrevivência dos rizóbios, é dependente da associação de produtos realizada e do tempo de armazenamento, podendo resultar em efeito nulo, estimulante ou deletério às células bacterianas, mesmo diante da conjugação de protetores celulares. Assim, os dados gerados neste estudo, de forma similar a inúmeros trabalhos citados na bibliografia, comprovam a complexidade de interações presente no tratamento de sementes que associam produtos fitossanitários e biológicos, mesmo na presença de protetores celulares, as quais exigem prudência, cautela, sensatez, ponderação e especificidades na ultimação de estudos desta natureza, descartando a possibilidade de conclusões genéricas.

4.3.Experimento 3:Efeito do tratamento de sementes na infectividade e eficiência de rizóbios na fixação biológica denitrogênio

Os dados relativos à infectividade e à eficiência na fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja, do cultivarBMX Apolo RR,geradas a partir de sementes tratadas com diferentes produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, combinados ou não, e com um inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, acompanhado ou não por protetor celular de rizóbios,em experimento implantado no tempo zero, ou seja, no dia do tratamento das sementes, são observados nas Tabelas 8 e 9.

Parte dos tratamentos influenciou o número de nódulos e a massa de matéria seca de nódulos (MMSN) por planta (Tabela 8).O número de nódulos por planta e a MMSN demonstram que todos os tratamentos diferenciaram-se do T1 (Testemunha absoluta), à exceção dos tratamentosT7 (Apron RFC + inoculante), T10 (Standak + inoculante) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), que se destacaram por apresentarem os menores valores (Tabela 8). Entretanto, dentre estes tratamentos, o T10, com produção de nódulos 73% inferior ao T2 (Inoculante + protetor celular), foi o único ineficaz na indução de nodulação em equivalência ao tratamento T2. Contudo, embora este baixo número de nódulos do tratamento T10tenha proporcionado MMSN65% menor que a do tratamento T2, estes dois tratamentos não diferiram entre si para esta variável analisada(Tabela 8).

Revisão bibliográfica elaborada por Tu (1977) denota que estudos relativos ao tratamento de sementes, contemplando variados princípios ativos de ação fitossanitária, não resultaram em efeito sobre o número de nódulos por planta e nem sobre a massa de matéria seca de nódulos e de raízes. Entretanto, Pereira et al. (2010) obtiveram resultados significativos para o número de nódulos por planta e, inclusive para o número de vagens por planta, ao estudar o tratamento de sementes de soja, com produtos fitossanitários e inoculante, de forma isolada e combinada. Estes autores observaram também redução média da ordem de 52% no número de nódulos por planta nos tratamentos que receberam produtos fitossanitários associados ao inoculante.

Tabela 8. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, no número de nódulos e na massa de matéria seca de nódulos (MMSN), em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.

Tratamento	Nódulos (número)	MMSN (g)
T1 Testemunha absoluta	1 c	0,02 c
T2 Inoculante + protetor celular	116 a	0,23 ab
T3 Inoculante	111 ab	0,22 ab
T4 Avicta 500 FS + inoculante	163 a	0,25 a
T5 Sedaxane + inoculante	128 a	0,22 ab
T6 Cruiser 350 FS + inoculante	113 a	0,21 ab
T7 Apron RFC + inoculante	82 abc	0,14 abc
T8 Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	130 a	0,20 ab
T9 Derosal Plus + inoculante	120 a	0,19 ab
T10 Standak + inoculante	31 bc	0,08 bc
T11 Standak + inoculante + protetor celular	111 ab	0,22 ab
T12 Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	130 a	0,28 a
T13 Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	87 abc	0,17 abc

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Zilli et al. (2010b), pesquisando inoculação de sementes de soja com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, constataram redução da ordem de 50% no número de nódulos quando as sementes foram tratadas com os fungicidas Carbendazim + Thiram e Carboxin + Thiram. Utilizando as misturas de Thiabendazole + Thiram e Carbendazim + Thiram, Campo e Hungria (2000) verificaram redução média de 18 a

78% no número de nódulos em plantas de soja, oriundas de sementes tratadas com estes produtos fitossanitários e cultivadas em diferentes campos experimentais. Bigaton (2005), estudando os mesmos fungicidas, observou que estes produtos não causaram decréscimo no número e nem na massa de matéria seca de nódulos em plantas crescidas em casa de vegetação.

Costa et al. (2013), ao tratarem sementes de soja com Fludioxonil + Mefenoxam e Carbendazim + Thiram, associados a inoculante contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, verificaram que estes fungicidas induziram reduções de 24,7% e 48,2% no número de nódulos, respectivamente. Experimentos conduzidos com estes princípios ativos, porém em diferentes formulações, mostram que a compatibilidade dos mesmos com os rizóbios não necessariamente é similar.

Bueno et al. (2003), estudando o tratamento de sementes de soja com Thiram, Carbendazim, Carboxin + Thiram e Carbendazim + Thiram de forma isolada e associados a estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, constataram que os tratamentos que envolveram estes fungicidas reduziram em mais de 10% o número total de nódulos na raiz principal das plantas de soja ao compará-los à testemunha apenas inoculada. Entretanto, os fungicidas testados não reduziram a nodulação total da planta.

Estes comportamentos desconhecidos, encontrados na bibliografia, foram, em parte, constatados no estudo atual, pois houve tratamento que afetou o número de nódulos em relação ao tratamento T2 (Inoculante + protetor celular), sem, contudo diferenciar-se do T3 (Inoculante), como foi o caso do T10 (Standak + inoculante), e houve os casos dos demais tratamentos, à exceção do T1 (Testemunha absoluta), que não afetaram a nodulação das plantas de soja e nem a massa de matéria seca de nódulos (Tabela 8).

Em referência à massa de matéria seca da parte aérea das plantas (MMSPA) e à massa de matéria seca de raiz (MMSR), observa-se que todos os tratamentos, resultaram superiores ao T1 (Testemunha absoluta), sem, contudo diferenciarem-se entre si (Tabela 9). A diferenciação de todos os tratamentos em relação ao T1, certamente é devida à supressão de nitrogênio na solução nutritiva adicionada aos vasos Leonard e à ausência de inoculação das sementes com o inoculante Cell Tech HC, formulado à base das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, de *Bradyrhizobium*

japonicum. Quanto ao comprimento de raiz (CR), denota-se que o comportamento dos tratamentos não foi similar à MMSPA e à MMSR. O tratamento T1 (Testemunha absoluta), mesmo sob a supressão de nitrogênio, tanto na solução nutritiva quanto via fixação biológica, se enquadrou no grupo dos tratamentos que apresentou o maior CR, formado por T3 (Inoculante), T6 (Cruiser 350 FS + inoculante), T7 (Apron RFC + inoculante) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular). Destaca-se que, no T1, as raízes se apresentaram mais finas, alongadas e menos volumosas.

Tabela 9. Efeito do tratamento de sementes de soja, cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, na massa de matéria seca da parte aérea da planta (MMSPA), na massa de matéria seca de raiz (MMSR), no comprimento de raiz (CR) e no teor de nitrogênio total (N-total) da parte aérea da planta, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.

Tratamento		MMSPA	MMSR	CR	N-total
		(g)	(g)	(cm)	(%)
T1	Testemunha absoluta	2,2 b	0,9 c	66,0 a	1,10 d
T2	Inoculante + protetor celular	5,7 a	1,3 ab	59,8b	1,99 ab
T3	Inoculante	6,2 a	1,5 a	66,5 a	2,13 a
T4	Avicta 500 FS + inoculante	5,9 a	1,6 a	55,2 b	1,85 ab
T5	Sedaxane + inoculante	6,0 a	1,5 a	54,8 b	1,93 ab
T6	Cruiser 350 FS + inoculante	5,6 a	1,6 a	66,0 a	1,93 ab
T7	Apron RFC + inoculante	5,6 a	1,5 a	67,5 a	2,22 a
T8	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxan + inoculante	5,8 a	1,4 ab	58,0 b	2,19 ab
T9	Derosal Plus + inoculante	5,8 a	1,7 a	60,8b	2,03 ab
T10	Standak + inoculante	5,3 a	1,5 a	58,5 b	1,76 bc
T11	Standak + inoculante + protetor celular	6,9 a	1,6 a	56,2 b	2,04 ab
T12	Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	5,9 a	1,4 ab	61,1 b	2,27 a
T13	Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular	5,3 a	1,5 a	56,0 ab	1,49 bc

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Nunes (2006), avaliando o efeito do Thiametoxan na germinação de sementes de soja, verificou que este inseticida proporcionou alongamento e fasciculação do sistema radicular das plântulas. Por outro lado, Denardin (2009), estudando este mesmo produto em soja, observou que sua associação com inoculante aumentou a massa de matéria seca das raízes e da parte aérea, bem como, a altura da planta e o

teor de nitrogênio-total na parte aérea de plantas de soja. Outros estudos revelam que o Thiametoxan não afeta o comprimento e nem a massa de matéria seca de raiz e, tão pouco a massa de matéria seca da parte aérea.

Pesquisa realizada por Guimarães et al. (2005) mostra que o inseticida Thiametoxan afetou a altura de plântulas de feijão preto oriundas de sementes tratadas há 10 e 30 dias antes da semeadura. Esta informação culmina com os resultados de outros trabalhos, em que o armazenamento de sementes de soja tratadas com produtos fitossanitários pode influenciar na germinação e no vigor das sementes. Em adição Guimarães et al. (2005) evidenciam que fatores genéticos, intrínsecos do cultivar e/ou de diferentes espécies, são mais ou menos responsivos a determinadas moléculas químicas, podendo reagir positiva ou negativamente quando expostos a elas.

Zilli et al. (2010b) verificaram que, ao tratarem sementes de soja com os fungicidas Carbendazim + Thiram e Carboxin + Thiram, de forma isolada e associada a estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*, houve redução no número de nódulos e na produtividade de grãos de soja, apenas para os tratamentos inoculados com estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*.

Quanto ao teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas de soja, observa-se que, de forma similar ao observado para a MMSPA e a MMSR, todos os tratamentos foram superiores ao T1 (Testemunha absoluta). Contudo, os tratamentos T3 (Inoculante), T7 (Apron RFC + inoculante) e T12 (Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular), ao apresentarem os maiores teores de nitrogênio-total na parte aérea das plantas, diferenciaram-se dos tratamentos T10 (Standak + inoculante) e T13 (Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane + inoculante + protetor celular) (Tabela 9). A diferenciação de todos os tratamentos em relação ao T1, certamente é resultante da supressão de nitrogênio na solução nutritiva empregados vasos Leonard e à ausência de inoculação das sementes com o inoculante Cell Tech HC, que continha as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, de *Bradyrhizobium japonicum*.

Segundo Döbereiner (1967), existe relação direta e positiva entre a massa de matéria seca de nódulos e o teor de nitrogênio-total na parte aérea de plantas de soja, sendo este o indicador mais adequado para avaliar o estabelecimento da

simbiose entre rizóbio e plantas de soja. Nesse sentido, a análise de regressão estabelecida entre a massa de matéria seca de nódulos (Tabela 8) e o teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas de soja (Tabela 9) mostrou-se significativa (Figura 1).

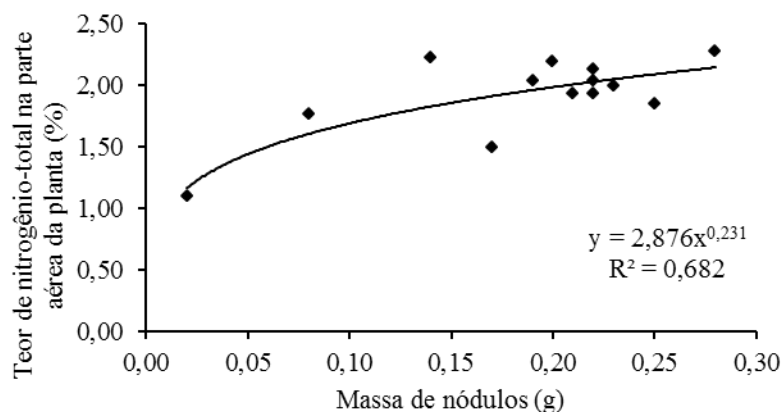


Figura 1. Correlação entre a massa de matéria seca de nódulos por planta e o teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários, de ação inseticida e fungicida, e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.

Entretanto, trabalhos mostram que nem sempre essa relação é direta e positiva, pois o número de nódulos e a massa de matéria seca de nódulos, muitas vezes, não apresentam relação positiva direta. No presente estudo, além do relacionamento significativo entre o teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas e a massa de matéria seca de nódulos, a análise de regressão entre a massa de matéria seca de nódulos e o número de nódulos também se mostrou positiva e significativa (Figura 2). Em adição, a análise de correlação estabelecida entre a variável UFC semente⁻¹, quantificada no tempo zero do Experimento 2, “Efeito do tratamento de sementes na sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes” (Tabela 7) e as variáveis quantificadas no Experimento 3 “Infectividade e eficiência na fixação biológica de nitrogênio” (tabelas 8 e 9), revela que o teor de nitrogênio-total se relacionou, positiva e significativamente, com todas variáveis, porém, embora tenha apresentado relação positiva com a concentração de UFC semente⁻¹ e com o comprimento de raiz, os índices de correlação não atingiram nível de significância (Tabela 10). Embora o índice de correlação entre o teor de nitrogênio-

total na parte aérea das plantas e a concentração de UFC semente⁻¹, $R = 0,2496$, não tenha atingido nível de significância, a Figura 3 demonstra que tratamentos com concentrações de UFC semente⁻¹ abaixo do limite mínimo de 6×10^5 UFC semente⁻¹, indicado pelo MAPA, produziram teores de nitrogênio-total na parte aérea das plantas similares aos tratamentos com concentrações acima da defendida pelo MAPA. Estes dados evidenciam a complexidade e a magnitude de interações encontradas na prática do tratamento de sementes, ao se associar produtos fitossanitários com protetores celulares e inoculantes.

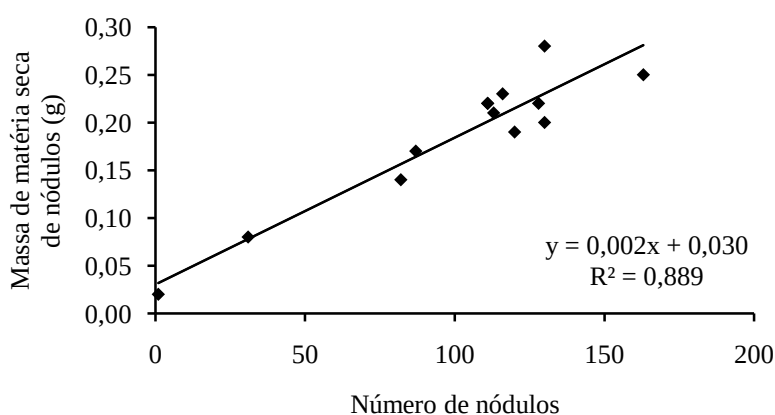


Figura 2. Correlação entre o número de nódulos por planta e a massa de matéria seca de nódulos em plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.

Trabalhos realizados por Caldwell e Vest (1968) relatam haver especificidade de aceitação entre cultivares de soja e estirpes de *Bradyrhizobium*. Esta mesma constatação é relatada por Bárbaro et al. (2009), ao constatarem que a interação não se restringe à taxa de inoculação, mas também à aplicação de cobalto e molibdênio. A aplicação de cobalto e molibdênio não incrementou a massa de matéria seca de raiz e a prática de inoculação, associada à adubação foliar com estes micronutrientes, não promoveu acréscimo à massa de matéria seca foliar dos cultivares quando comparados às respectivas testemunhas.

Segundo Bueno et al. (2003), em estudo *in vitro* com Thiabendazole + Thiram, verificaram que, aparentemente, estes fungicidas estimularam o desenvolvimento do rizóbio, sendo inclusive superior ao da testemunha. Estes

autores, estudando o comportamento das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5079, frente aos fungicidas Tiofanato metílico, Carbendazin + Thiram e Carboxin + Thiram, verificaram que a SEMIA 5019 foi beneficiada pelo Carboxin + Thiram e que a SEMIA 5079 foi prejudicada.

Tabela 10. Matriz de correlação linear Pearson, dos indicadores de infectividade e eficiência na fixação biológica de nitrogênio em experimento conduzido em vasos Leonard a partir de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, instalado no dia da realização do tratamento das sementes.

Matriz de correlação	UFC semente ⁻¹	Nº de nódulos	MMSN	MMSPA	MMSR	CR	N-total
UFC semente ⁻¹	1						
Nº de nódulos	0,1733	1					
MMSN	0,3493	0,9430	1				
MMSPA	0,2359	0,7665	0,7933	1			
MMSR	-0,0759	0,6179	0,5548	0,8289	1		
CR	0,2098	-0,3902	-0,3315	-0,3957	-0,3028	1	
N-total	0,2496	0,6781	0,7060	0,8056	0,5776	0,0267	1

Obs.: UFC semente⁻¹: unidade formadora de colônia por semente; Nº de nódulos: número de nódulos por planta; MMSN: massa de matéria seca de nódulos por planta; MMSPA: massa de matéria seca da parte aérea das plantas de soja; MMSR: massa de matéria seca de raiz de plantas de soja; CR: comprimento de raiz de plantas de soja; N-total: teor de nitrogênio total nas plantas de soja.

Revellin et al. (1993) evidenciaram leve efeito fitotóxico do fungicida Carboxin + Thiram sobre a nodulação da soja, 24 horas após o tratamento das sementes inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. Bigaton et al. (2005), trabalhando com plantas de soja, não verificaram decréscimos nem no número, nem na massa de matéria seca de nódulos e, tão pouco, no teor de nitrogênio foliar, quando sementes de soja foram tratadas com diferentes fungicidas. Segundo Martensson (1992), alteração nos exsudatos radiculares da soja poderia alterar a sinalização molecular entre a planta e a bactéria e, conseqüentemente interferir no reconhecimento desta à planta específica. Estes aspectos são de relevância, pois há variação genética tanto da planta hospedeira quanto da bactéria e, quando expostas à estresses biótico e/ou abiótico, podem mostrar diferenças no comportamento fisiológico.

Bueno et al. (2003) não evidenciaram qualquer redução na nodulação em plantas de soja quando estudaram o efeito dos fungicidas Thiram, Thiabendazole + Thiram, Metalaxyl, Difenconazole + Thiram, Carbendazim + Thiram, Fludioxonil +

Metalaxyl M, Tiofanato metílico + Tolyfluanid, Thiabendazole e Captan na sobrevivência da estirpe SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*, em estudo realizado em casa de vegetação ou em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Cattelan et al. (1995), avaliando o efeito dos fungicidas Captan, Carboxin + Thiram, Thiabendazol, Thiram, Thiram + Thiabendazol e Pentacloronitrobenzeno + Thiabendazol sobre as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 em diferentes concentrações, em inoculante turfoso, sob condições estéreis de casa de vegetação, encontraram resultados semelhantes. A massa de matéria seca da parte aérea não foi afetada quando comparada ao tratamento testemunha, que recebeu apenas inoculação. O único fungicida que resultou em efeito negativo sobre o número de nódulos, a massa de nódulos e o teor de nitrogênio no tecido foliar, foi o Captan.

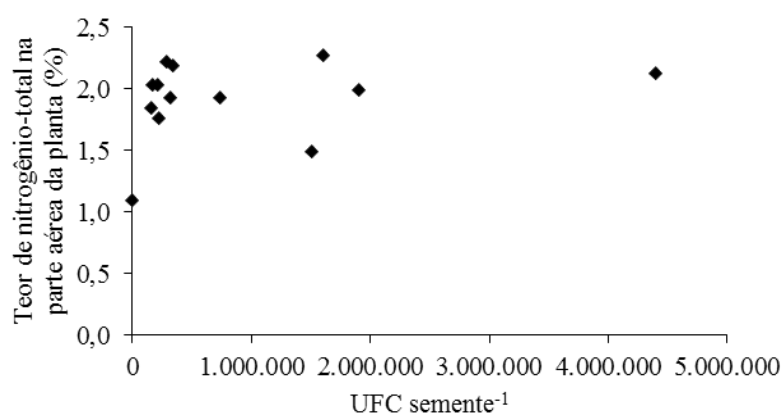


Figura 3. Relação entre a concentração de unidades formadoras de colônia por semente (UFC semente⁻¹) e o teor de nitrogênio-total na parte aérea de plantas de soja, do cultivar BMX Apolo RR, oriundas de sementes tratadas com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum*, com e sem protetor celular, em experimento instalado no dia da realização do tratamento de sementes.

Ahemad e Khan (2012, 2011, 2008), após recuperar bactérias do gênero *Bradyrhizobium* de nódulos de plantas de vignia, verificaram que os isolados com capacidade máxima de tolerância fungicida produziram maiores quantidades de substâncias promotoras de crescimento de plantas. Entre as nove cepas bacterianas selecionadas, um isolado, o MRM6, foi selecionado devido à elevada capacidade de tolerar aos fungicidas Triazol e Tebuconazole (cromatograficamente puros), até

1.600 ng mL⁻¹. Este isolado ainda foi capaz de crescer em tensões de sais em meio mínimo suplementado com 100, 200 e 300 µg L⁻¹ de Tebuconazole.

O isolado MRM6 proporcionou maior crescimento das plantas e sintetizou as maiores quantidades de promotores de crescimento, como o ácido indol acético, sideróforos, exopolissacarídeos, cianato de hidrogênio e amoníaco, tanto na ausência quanto na presença de 100, 200, e 300 µg L⁻¹ de Tebuconazole. Essa estirpe ao ser usada como inoculante, em experimento em casa de vegetação, contemplando estas três doses de Tebuconazole, curiosamente aumentou os parâmetros fitoquímicos em relação aos tratamentos com Tebuconazole sem inoculação. Este estudo infere que a estirpe MRM6 de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) é compatível com Tebuconazole e pode ser co-inoculada com o mesmo (AHEMAD E KHAN, 2012, 2011, 2008). Estes resultados permitem afirmar que, nem todos os inoculantes contêm cepas capazes de tolerar a presença de fungicidas e/ou de inseticidas, visto que quando as bactérias são expostas a eles, geralmente, as plantas apresentam baixa nodulação e, em consequência, produzem menos biomassa e diminuem a absorção de nutrientes, proporcionando menor ou igual produção de grãos em relação à testemunha.

Outros autores, como Appunu et al. (2008), também verificaram em condições de campo, na Índia, que três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (ASR011, USDA123 e CB1809), foram capazes de maior especificidade com os cultivares de soja JS335, Lee e Bragg, sendo essa interação em termos de incremento na fixação biológica de nitrogênio. Estas observações são relevantes, uma vez que se tem observado, em vários estudos, divergências de resultados, tanto para o número de nódulos quanto para o teor de nitrogênio-total na parte aérea da planta. A interação é definida pela herança genética entre planta e bactéria, que podem ter diferenças intrínsecas na capacidade simbiótica, adquiridas e desenvolvidas em co-evolução. Segundo Sadowsky et al. (1995), um determinado genótipo hospedeiro pode restringir a infecção de uma estirpe e, em decorrência, refletir na eficiência simbiótica e na fixação de nitrogênio atmosférico. Pesquisa realizada por Hungria e Bohrer (2000), em vasos com 152 cultivares de soja, observaram que alguns apresentaram o dobro da massa de matéria seca de nódulos.

Assim, vários são os fatores que podem interferir na relação planta-bactéria, dentre estes se destacam a estirpe utilizada, a dose de inoculante ou a concentração

de células por grama ou mililitro de inoculante, produtos químicos empregados no tratamento de sementes, corantes e adesivos, bem como as condições ambientais (CAMPO e HUNGRIA, 2000). A aplicação de fungicidas via tratamento de sementes pode reduzir significativamente a população de *Bradyrhizobium* nas mesmas (ANNAPURNA, 2005) e reduzir o número e a matéria seca de nódulos (ANDRÉS et al., 1998; BIKROL et al., 2005). Porém, dependendo dos inseticidas ou dos fungicidas aplicados às sementes, trabalhos mostram que esses não mostram efeitos negativos significativos sobre a nodulação (BIGATON, 2005).

Os resultados do presente estudo comprovam a complexidade das interações implicadas na prática do tratamento de sementes, mediante associação de produtos de natureza química e biológica, que indubitavelmente interagem ao nível de sinais bioquímicos. Em decorrência, é possível que UFC, presentes e viáveis junto às sementes, podem não infectar as raízes das plantas e, conseqüentemente não fixarem nitrogênio atmosférico. Por outro lado, baixas concentrações de UFC semente⁻¹ podem infectar em suficiência as raízes das plantas e resultarem em eficiente fixação biológica de nitrogênio.

Os mecanismos que interagem na rizosfera das plantas ainda são muito pouco conhecidos. Contudo, sabe-se que aspectos bioquímicos e fisiológicos são afetados por fatores bióticos e abióticos. Em adição, a prática do tratamento de sementes se depara, a cada safra agrícola, com um novo elenco de produtos fitossanitários, nutricionais, biológicos e bioestimulantes, bem como com novos cultivares. Desse modo, o desenvolvimento de tecnologias direcionadas ao pré-tratamento ou ao armazenamento de sementes tratadas, se constitui em desafio constante.

Os resultados encontrados no presente trabalho, comparados a outros demonstram que ainda são necessários estudos de metodologia de análise e, segundo Costa et al. (2013), os resultados não devem ser generalizados quando tratar-se de bactérias fixadoras de nitrogênio. Portanto, nesta área do conhecimento, estudos simplistas podem estar contribuindo para esta comprovada inconsistência de resultados observados na bibliografia de pertinência.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as especificidades e a complexidade das interações implicadas na prática do tratamento de sementes, mediante associação de produtos de natureza química e biológica, é prudente evitar conclusões generalizadas. Em decorrência, pode-se afirmar que:

- a) O tratamento de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com um inoculante biológico, portador das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, associado ou não a protetor celular de rizóbios:
 - a₁) interferiu no potencial fisiológico das sementes, proporcionando percentuais de germinação abaixo do padrão de 80% estipulado pela Instrução Normativa número 09, de 2 de junho de 2005, somente no tempo zero de armazenamento com os produtos Apron RFC, Derosal Plus e Standak, empregados de forma individualizada, porém combinados ao inoculante líquido Cell Tech HC; e
 - a₂) interferiu no vigor das sementes, sem, contudo proporcionar percentuais de germinação abaixo do padrão de 80% recomendados para a comercialização pela Instrução Normativa número 09, de 2 de junho de 2005).
- b) O tratamento de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com um inoculante biológico, portador das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, associado ou não a protetor celular de rizóbios, e submetidas ao envelhecimento acelerado aos 150 dias após o tratamento das sementes:
 - b₁) interferiu no potencial fisiológico das sementes, assegurando o percentual de germinação no padrão de 80% estipulado pela Instrução Normativa número 09, de 2 de junho de 2005, com os produtos Avicta 500 FS, Cruiser 350 FS, Apron RFC, Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane e Standak combinados ao inoculante líquido Cell Tech HC e com

os produtos Standak, Derosal Plus e Standak, Avicta 500 FS + Maxin XL + Sedaxane, Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane combinados ao inoculante líquido Cell Tech HC e ao protetor de células de rizóbios HiCoat;

- b₂) interferiu no comprimento das raízes das plântulas normais emergidas em areia, tendo Standak combinado ao inoculante líquido Cell Tech HC e ao protetor de células de rizóbios HiCoat como o único tratamento a diferenciar-se da testemunha absoluta e apresentar o menor valor;
- b₃) interferiu na massa de matéria seca das raízes das plântulas normais emergidas em areia, tendo Sedaxane, Apron RFC, Avicta 500FS + Maxin XL + Sedaxane, Derosal Plus e Standak combinados com o inoculante líquido Cell Tech HC e Avicta 500FS + Maxin XL + Sedaxane combinado ao inoculante líquido Cell Tech HC e ao protetor de células de rizóbios HiCoat como os únicos a não diferenciarem-se da testemunha absoluta.
- c) O tratamento de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com um inoculante biológico, portador das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, associado ou não a protetor celular de rizóbios, interferiu na concentração de UFC semente⁻¹:
- c₁) mantendo concentrações na grandeza de 10⁶ UFC semente⁻¹, conforme preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apenas no tempo zero de armazenamento, ou seja, no dia do tratamento das sementes; e
- c₂) tendo os produtos Avicta 500FS + Maxin XL + Sedaxane combinado ou não ao inoculante líquido Cell Tech HC e ao protetor de células de rizóbios HiCoat, com concentrações da ordem de 10⁶ UFC semente⁻¹ e como os únicos tratamentos similares às testemunhas tratadas apenas com o inoculante e o protetor celular de rizóbios, combinados ou não.
- d) O tratamento de sementes de soja, do cultivar BMX Apolo RR, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida e com um inoculante biológico, portador das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, associado ou não a protetor celular de rizóbios:

- d₁) interferiu no número de nódulos e na massa de matéria seca de nódulos, estabelecendo relação direta e positiva entre estas variáveis;
- d₂) não interferiu na massa de matéria seca da parte aérea das plantas e nem na massa de matéria seca das raízes das plantas;
- d₃) interferiu no comprimento de raízes, tendo os produtos Cruiser 350 FS e Apron RFC combinados ao inoculante líquido Cell Tech HC e Avicta 500 FS + Cruiser + Maxin XL + Sedaxane combinado ao inoculante líquido Cell Tech HC e ao protetor de células de rizóbios HiCoat como os únicos tratamentos similares à testemunha absoluta e à testemunha apenas inoculada; e
- d₄) interferiu no teor de nitrogênio-total na parte aérea das plantas, estabelecendo relação positiva com a massa de matéria seca de nódulos.

6. CONCLUSÕES

O estudo do tratamento de sementes de soja, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida, associados à inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, com ou sem protetor celular de rizóbios, afetou a emergência, em avaliação realizada aos quatro dias após a semeadura, independentemente do tempo de armazenamento após do tratamento, porém não afetou a Contagem Final de Plântulas Emergidas - CFPE, em avaliação aos 15 dias após a semeadura, nos tempos de armazenamento de 15 e 150 dias após o tratamento.

O estudo do tratamento de sementes de soja, com produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida, associados à inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, com ou sem protetor celular de rizóbios, afetou a sobrevivência de unidades formadoras de colônia de rizóbios inoculados às sementes e ainfetividade e a eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio, em experimento instalado no dia da realização do tratamento das sementes.

Os resultados auferidos do estudo de tratamento de sementes de soja, envolvendo produtos fitossanitários de ação inseticida e fungicida, associados à inoculante biológico, portador de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, com ou sem protetor celular de rizóbios, demonstram efeitos particularizados para as variadas combinações destes insumos, que inviabilizam conclusões generalizadas, inferindo que pesquisas simplistas podem estar contribuindo para a comprovada inconsistência de conclusões observadas na bibliografia de pertinência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários. Ingredientes Ativos. 2010. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit>. Acesso em: 6 janeiro. 2014.
- AHEMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, n.2, p.173-181, 2008.
- AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Effect of pesticides on plant growth promoting traits of greengram-symbiont, *Bradyrhizobium* sp. strain MRM6. *Bull Environ Contam Toxicol*. 86(4):384-8. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. 2011. <http://toxgate.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?./temp/~lXb9XF:@and+@mh+@term+Symbiosis>
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**. 2012.
- ALMEIDA, A. S.; CARVALHO, I.; DEUNER, C.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 3 p. 501 - 510, 2011.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.63-94. CNPSo, 1995. p.398-402.
- ANDRÉS, J. A.; CORREA, N. S.; ROSAS, S. B. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, n. 2, p. 141-145, 1998.
- 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.
- APPUNU, C.; SEN, D. SINGH, M.K.; DHAR, B. Variation in symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* strains and soybean cultivars under field conditions. **Journal of Central European Agriculture**, 9: 185-190, 2008.
- ARAÚJO, A.S.F.; ARAUJO, R.S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, vol.36, n.3, pp. 973-976, 2006.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R.F.V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Co-inoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: Efeito sobre a

nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v35n3/v35n3a06.pdf> > Acesso em: 25 julho de 2014.

ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1633-1643, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 93p. (Chapa 5). <http://www.nsl.fs.fed.us/chapter%205.pdf>

AVELAR, S.A.G.; BAUDET, L.; PESKE, S.T.; LUDWIG, M.P.; RIGO, G.A.; CRIZEL, R.L.; OLIVEIRA, S. Storage of soybean seed treated with fungicide, insecticide and micronutrient and coated with liquid and powered polymer. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1719-1725, 2011. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782011001000007&script=sci_arttext.

BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 114p. Tese (Mestrado em Ciência do Solo) Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BARBARO, I. M.; CENTURION, M. A. P. C.; GAVIOLI, E. A.; SARTI, D. G. P.; BÁRBARO JÚNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B. Análise de cultivares de soja em resposta à inoculação e aplicação de cobalto e molibdênio. **Revista Ceres**, v. 56, p. 342-349, 2009.

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.

BARROS, R. G.; YOKOYAMA, M.; COSTA, J. L. da S. Compatibilidade do inseticida thiamethoxan com fungicidas utilizados no tratamento de sementes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.31, n.2, p.153-157, 2001.

BAUDET, L.; PESKE, F. Aumentando o desempenho das sementes. **Seed News**, v.9, n.5, p.22-24, 2007.

BAYS, R.; BAUDET, L.; HENNING, A. A.; LUCCA FILHO, O. Recobrimento de sementes de soja com micronutrientes, fungicida e polímero. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.2, p.60-67. 2007.

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 nitrogênio**. 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.

BODDEY, L. H. **Determinação das características das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* nas estirpes brasileiras noduladoras de soja**. 1995. 130 p. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, 1995. 130p.

BOHRER, T. R. J. e HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:937-952, 1998.

BOTHA, W. J.; JAFTHA, J.B.; BLOEM, J. F.; HABIG, J. H.; LAW, I. J. Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculants strain CB 1809. **Microbiology Research**, v.159, p.219-231, 2004.

BRADLEY, C. A. Effect of fungicide seed treatments on stand establishment, seedling disease, and yield of soybean in North Dakota. **Plant Disease**, v. 92, n. 01, p. 120-125, 2008.

BRAGUINI, W. L. **Efeitos da deltametrina e do glifosato, sobre parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, sobre membranas artificiais e naturais e experimentos in vivo**. 2005. 174f. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399p.

BUENO, C.J.; MEYER, M.C.; SOUZA, N.L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.25, n.1, p.231-235, 2003.

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 Scient.: Agron.** 25: 231-235, 2003.

CALDWELL, B. E.; VEST, G. Nodulation interaction between soybean genotypes and serogroups of *Rhizobium japonicum*. **Crop Science**, 8: 680-682. 1968.

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, J. R.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 26).

CAMPO, J. R.; HUNGRIA, M.; LAURETO, E.; MIURA, L. M.; SIBALDELLI, R. N. R.; MORAIS, J. Z.; SOUZA, M. Compatibilidade de aplicação de inoculantes

com defensivos agrícolas e micronutrientes. In: CAMPO, C. B. H.; SARAIVA, O. F. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja-2002**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 20-38. (Documentos, 216).

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CARVALHO, F. G.; SELBACH, P. A.; BIZARRO, M. J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Rev.Bras. Ciênc. Solo** [online]. 2005, vol.29, n.6, pp. 883-891.

CASTRO, G. S. A.; BOGIANI, J. C.; SILVA, M. G. S.; GAZOLA, E.; ROSOLEM, C. A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.43, n.10, p.1311-1318, out. 2008.

CATANEO, A. C. Ação do Tiametoxam (Thiametoxan) sobre a germinação de sementes de soja (*Glycine Max*. L.) Enzimas envolvidas na mobilização de reservas e na proteção contra situações de estresse (deficiência hídrica, salinidade e presença de alumínio). . In: Gazzoni, D.L. (Ed). **Tiametoxam:Uma revolução na agricultura brasileira**. São Paulo: editora Vozes. p.126-194. 2008.

CATTELAN, A. J.; SPOLADORI, C. L.; HENNING, A. A. Efeito do tratamento de sementes de soja com fungicidas recomendados sobre a fixação do nitrogênio atmosférico e a sobrevivência do *Bradyrhizobium japonicum* em casa de vegetação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E *BRADYRHIZOBIUM*, 6., 1994, Londrina. **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**: anais. Londrina: IAPAR, 1995. p. 399-403.

CECCON, G.; RAGA, A.; DUARTE, A. P.; SILOTO, R. C. Efeito de inseticidas na semeadura sobre pragas iniciais e produtividade de milho safrinha em plantio direto. **Bragantia**, v.63, n.2, p.227-237. 2004. <http://www.scielo.br/pdf/brag/v63n2/21372.pdf>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. Safra 2013/2014, 8º levantamento. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_gaos_mai_2014.pdf. Acesso em:09. acesso em junho de 2014.

COSTA, M. R.; CAVALHEIRO, J. C. T.; GOULART, A. C. P. MERCANTE, F.M. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa phytopathol.** v.39, n.3, p. 186-192, 2013.

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.; LEMOS, L. A.; BARROSO, A. L. B. Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas sob efeito do armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 32, nº 2 p. 131-139, 2010

DENARDIN, N. D. A aplicação de inoculantes define o sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**. USP, ESALQ. Piracicaba, SP. . 2006.

DENARDIN, N.D.; GRAFF, A.R.G.; TRENTIN, A.C.; SBALCHEIRO, C.C. Ação de fungicidas sobre a inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium jonicum*. **Fitopatologia Brasileira**. Suplemento. v.31. 2005 .

DENARDIN, N. D. Ação do Tiametoxam sobre a fixação biológica do nitrogênio e na promoção de crescimento vegetal. In: GAZZONI, D.L. (Coord.). **Tiametoxam: uma revolução na agricultura brasileira**. 1ª São Paulo: editora Vozes. 2008. p. 74 – 126.

DENARDIN, N. D. **Fixação biológica de nitrogênio em interação com produtos fitosanitários, químicos e biológicos, por leguminosas**. In: WORKSOP BRASILEIRO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES. 3., Informativo ABRATES, v.20, n.3, p.87, 2010.

DENARDIN, N. D. **Seleção de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tolerantes a fatores de acidez e resistentes a antibióticos**. 1991., 89 p. Dissertação (mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2: 475-487, 1967.

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

EGLI, D. B.; TEKRONY, D. M. Relationship between soybean seed vigor and yield. **Agron. J.**, Madison, v. 71, n. 5, p. 755-759, 1979.

EGLI, D. B.; TEKRONY, D. M. Soybean seed germination, vigor and field emergence. **Seed Sci. Technol.**, Zürich, v. 23, n. 3, p. 595-607, 1995.

EMBRAPA SOJA. Sistemas de Produção Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013. - Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja. Acesso em 9/06/2014. <http://garoupa.cnpso.embrapa.br/download/SP15-VE.pdf> Sistema de Produção 15.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; FUKAMI, J.; CONCEIÇÃO, R. B.; HUNGRIA, M. **Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a**

cultura da soja. Comissão de Nutrição Vegetal, Fertilidade e Biologia do Solo. Resumos da XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - São Pedro, SP, agosto de 2011.

FERREIRA, E. P. B.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulation and grain yield by cowpea (*vignaunguiculata* L. Walp.) Inoculated with rhizobia, isolates. **Rev Caatinga** 24: 27-35. 2011.

FESSEL, S. A.; MENDONCA, E. A. F.; CARVALHO, R. V. Effect of chemical treatment on corn seeds conservation during storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.25-28, 2003.

FRANÇA, NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: EMBRAPA SOJA. **A cultura da soja no Brasil**. Londrina, 2000. 1 CD-ROM.

FRANÇA NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M.; COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico 38).

GADOTTI, G. I.; FARIAS, C. R. J.; MENEGHELLO, G. E. Seed treatment of minor crops. **Seed Science and Technology**, v.34, n.1, p.129-138, 2012. http://www.researchgate.net/publication/229090767_Seed_Treatment_of_Minor_Crops
<http://www.researchgate.net/publication/Seed/9fcfd50ae515d29669.pdf>

GIANASI, L.; FILHO, A.B.; FERNANDES, N.; LOURENÇO, S.A.; SILVA, C.L. Eficiência do fungicida captan associado a outros fungicidas no tratamento químico de sementes de soja. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.241-245, 2000.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.1, 2004.

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**. Londrina, v. 31, n. 1, p.40-49, 2009.

GUIMARÃES, R. N.; PORTO, T. B.; PEREIRA, J. M.; BARBOSA, L. A.; FERNANDES, P. M.; COSTA, R. B.; BARROS, R. G. Efeito do Tratamento de Sementes com Inseticidas na Emergência e Altura de Plântulas de Feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. p.94-99. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

GRAHAM, P. H.; OCAMPO, G.; RUIZ, L.D.; DUQUE, A. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. **Agronomy Journal**, 72:625-627, 1980.

HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. in Inoculants Made from Presterilized Peatt. **Applied and Environmental Microbiology**, Nov., p. 1246-1247 v. 44, n. 5, 1982.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 11 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 26).

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação Biológica no Brasil é um exemplo de sucesso. **Visão Agrícola**. USP, ESALQ. Piracicaba, SP. v.5, p. 152, 2006.

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

KLOEPPER, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience** 46: 406-409, 1996

KOBER, M. V.; SA, E. L. L.; FREIRE, J. R. J.; GIONGO, A. Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. **Cienc. Rural**, 2004, vol.34, n.5, pp. 1459-1464.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I. **Isolamento e caracterização de populações heterogêneas e mutantes espontâneos de duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp.** 1992. 124f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999.

LIAO, C. F. H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, v.45, p.852-855, 1981.

LARSON, K. **Evaluation of soybean inoculants products and techniques to address soybean nodulation problems in Kansas**. Degree 2013. Kansas, State University. <http://oatd.org/oatd/record?record=handle%5C:2097%5C%2F16303>

MACHADO, J. C. Controle de fitopatógenos associados a sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 91, n.8, p.34-40, 1982.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília, Ministério da Educação, 1988. 107p.

MACHADO, J. C. Tratamento de semente de feijão. In: **Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, 2. Resumos Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.64.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

McDONALD JUNIOR, M. B. Vigor test subcommittee report. *News Lett. Assoc. Off. Seed Anal.*, v. 54, n. 1, p. 37-80, 1980.

McDONALD JUNIOR.; M. B., PHANEENDRANATH, B. R. A modified accelerated aging vigor test procedure. **Journal of Seed Technology**, v.3, n.1, p.27-37, 1978.

McDONALD JUNIOR, M. B.; WILSON, D.O. An assessment of the standardization and ability of the ASA-610 to rapidly predict potential soybean germination. **J.Seed Technol.**, Springfield, v. 4, n. 2, p. 1-11, 1979.

MCKNIGHT, T. Efficiency of isolates of Rhizobium in the cowpea group, with proposed additions to this group. **Queensland Journal of Agricultural Science**, 6, 61-76, 1949.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p. 1-24.

MARCOS FILHO, J; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. Avaliação da qualidade das sementes. Piracicaba: FEALQ,. 230p. 1987

MARCOS FILHO, J; KIKUTI, A.L.P. Vigor de sementes de rabanete e o desempenho de plantas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n3, p.44-51, 2006.

MARCOS FILHO, J.; SHIOGA, P.S. Tratamento fungicida de sementes de soja no teste de envelhecimento rápido. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v.56, n.3, p.163-172, 1981.

MARCOS FILHO J; CÍCERO SM; SILVA WR. 1987. Avaliação da qualidade das sementes, Editora FEALQ, 347 p.

MARKS, B. B.; SAND, S. T. VAN DER.; BANGEL, E.V. Avaliação da sobrevivência de bradirrizóbios em sementes de soja tratadas com fungicidas, protetor celular "power" e o inoculante "nitragin optimize". **Revista Internacional de Ciências**. v.3 - n.1 · jan./jun. 2013. [http://hdl.handle.net/10183/16004/Pictures/Downloads/7063-25143-1-PB%20\(3\).pdf](http://hdl.handle.net/10183/16004/Pictures/Downloads/7063-25143-1-PB%20(3).pdf) (Trabalho apresentado no XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (2009) e com financiamento da Merck Crop Bioscience Argentina S/A.)

MARTENSSON, A. M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.*, v. 24, p. 435-445, 1992.

MENDES, I. C. ; REIS JUNIOR, F.B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D.M.G.; CAMPO, R.J. **Adubação Nitrogenada Tardia na Soja Cultivada em Latossolos do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009 (Comunicado Técnico 161).

MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SOAVE, J; OLIVEIRA, M. R. M. & MENTEN, J. O. M. (Ed.). Tratamento químico de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4, Gramado, 1996. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1996. p.3-23.

MERCANTE, F. M.; COSTA, M.R.; KAWSKI, N.L.; TARASIUK, V.A.; G O ULART, A.C.P. Sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp. em sementes de soja tratadas com fungicidas e seus efeitos na nodulação das plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007, Gramado. Conquistas e desafios para a ciência do solo brasileira: livro de resumos. Porto Alegre: SBCS, Núcleo Regional Sul, 2007. p. 33.

MILANI, G. L.; OLIVEIRA, J.A.; PEREIRA, E.M.; CARVALHO, B.O.; OLIVEIRA, G.E.; COSTA, R.R. Aplicação foliar de molibdênio durante a maturação de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 810-816, 2010.

MULLEN, M.D.; WOLLUN, A.G. Variation among different cultures of *Bradyrhizobium japonicum* strains USDA 110 and 122. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.583-588, 1989.

NASCIMENTO, W. M. O.; OLIVEIRA, B. J.; FAGIOLI, M.; SADER, R. Fitotoxicidade do inseticida carbofuran 350 FMC na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, n.2, p.242-245, 1996.

NUNES, J. C. S. Tratamento de sementes profissional: equipamentos e processos. In: WORKSHOP BRASILEIRO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES, 3. Informativo ABRATES, v.20, n.3, p.57, 2010.

NUNES. J. C., Bioativador de plantas, **Seeds News**, v.3, n.5, p.30-31, 2006.

OLIVEIRA, L.J.; CRUZ, I. Efeito de diferentes inseticidas e dosagens na germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.578-585, 1986.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.19-28, 2001.

PEIXOTO, A.R. controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes **Cienc. Rural** v.27 n.1 Santa Maria Jan./Mar. 1997.

PEREIRA, C. E; OLIVEIRA, J.A.; EVANGELISTA, J.R.E.; BOTELHO, F.J.E.; OLIVEIRA, G.E.; TRENTINI, P. Desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e peliculizadas durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p.656-665, 2007.

PEREIRA, C.E. Tratamento fungicida e peliculização de sementes de soja submetidas ao armazenamento. **Ciênc. agrotec.** [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 158-164.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, A.J.; CALDEIRA, C.M.; BOTELHO, E.J.F. Efeito do tratamento das sementes de soja com fungicidas e período de armazenamento na resposta da planta inoculada com *Bradyrhizobium*. **Revista Agro@mbiente** [online], v. 4, n. 2, p. 62-66, 2010.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VIEIRA, A.R.; EVANGELISTA, J.R.E.; OLIVEIRA, E.G. Tratamento fungicida e peliculização de sementes de soja submetidas ao armazenamento. **Ciênc. agrotec.** vol.35, n.1, p. 158-164, 2011.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J.A.; NETO, J.C.; MOREIRA, F.M.S.; VIEIRA, A.R. Tratamentos inseticida, peliculização e inoculação de sementes de soja com rizóbio. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 57, n.5, p. 653-658, set/out, 2010.

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**, Fortaleza, v.40, n.3, p.433-440, jul./set. 2009.

PEREIRA, M. A. **Tiametoxam em plantas de cana-de-açúcar, feijoeiro, soja, laranja e feijoeiro: parâmetros de desenvolvimento e aspectos bioquímicos**. 2010, 125p. (Tese de Doutorado em Ciências e Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010).

PEREIRA, O. A. P. **Tratamento de sementes de milho no Brasil**. In: MENTEN, J. O.M. ed. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. cap. 4/21, p. 71-280.

PIRES, L. L.; BRAGANTINI, CL; COSTA, J.L.D. Storage of dry bean seeds coated with polymers and treated with fungicides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,

39:709-715, 2004.

POPININGES, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília, DF: MA/AGIPLAN, 1985. 289p.

REVELLIN, C.; LETERME, P.; CATROUX, G. Effect of some fungicide seed treatment on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on nodulation and yield of soybean [Glyci [Glycine max (L.) Merrill]. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 16, p.211-214, 1993.

ROSA, K. C.; MENEGHELLO, E.G.; QUEIROZ, E.S.; VILLELA, A.F. Armazenamento de sementes de milho híbrido tratadas com tiametoxam **Informativo** vol.22, nº.3, 2012. ABRATES.

SADOWSKY, M. J, KOSSLAK, R.M, MADRZAK, C.J, GOLINSKA, B.; CREGAN, P.B. Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is mediated by factors present in the roots of Glycine max. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 832-836, 1995.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. **Doenças Fúngicas e Bacterianas da Parte Aérea**. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. ZIMMERMANN, M. J. O. Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. Piracicaba: Potafos, 1996, p. 71-99.

SATO, M. L. **Sobrevivência e estabilidade genética da SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* submetida à liofilização**. 1995. 157f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCHUCH, L. O. B.; NEDEL, J. L.; ASSIS, F. N.; MAIA, M. S. Crescimento em laboratório de plântulas de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) em função do vigor das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.229-234, 1999.

SEDIYAMA, C. A. Z. **Tratamento antecipado de sementes de soja com fungicida, protetor celular e inoculante** . 2012. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

SILVA, J.C.N. **Desempenho de sementes de milho tratadas com tiametoxam em função da dose e armazenamento**. 2008, 243p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2008.

SILVA NETO, M.L.; SMIDERLE, O.J.; SILVA, K.; JÚNIOR, P.I.F.; XAVIER, G.R.; ZILLI, J.E. Compatibilidade do tratamento de sementes de feijão-caupi com fungicidas e inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium*. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.48, n.1, p.80-87, 2013.

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

SILVEIRA, R.E.; MACCARI, M.; MARQUEZI, C.F. Avaliação do efeito de inseticidas aplicados via tratamento de sementes sobre o desenvolvimento de raízes de milho, na proteção de pragas do solo. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.246-249.

SMIDERLE, O.J.; CÍCERO, S.M. Tratamento inseticida e qualidade de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p. 462-469, 1998.

SINCLAIR, J.B. (Ed). **Compendium of soybean diseases**. 2.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 104 p.

SINGH, B.P.; AGARWAL, V.K. Effect of fungicidal seed treatment and *Rhizobium* inoculation on nodulation in soybean. *Seed Res.*, New Delhi, v.21, n.1, p.63-65, 1993.

SINGH, J.; LODHA, P.C. Compatibility of chemical seed protectants with *Bradyrhizobium japonicum* and their effect on symbiotic nodulation in soybean. **J. Mycol. Plant Pathol.**, Udaipur, v.7, n.2, p.148-151, 1997.

TAVARES, S.; CASTRO, P.R.C. Avaliação dos efeitos fisiológicos de Cruiser 35FS após tratamento de sementes de soja. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório técnico ESALQ/Syngenta**, 2005. p.1-13.

TAVARES, S.; CASTRO, P.R.C.; RIBEIRO, R.V.; ARAMAKI, P.H. Avaliação dos efeitos fisiológicos de thiametoxan no tratamento de sementes de soja. **Revista de Agricultura**, v.82, n.1, p.47-54, 2007.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Relationship of seed vigor to crop yield: A review. **Crop Science**, v.31, p.816-822, 1991.

TEKRONY, D.M. Accelerated ageing test. In: VAN DE VENTER, H. A. (Ed.). **Seed Vigour Testing Seminar**. Copenhagen: ISTA, 1995. p.53-72

TU, C.M. Effects of pesticide seed treatments on *Rhizobium japonicum* and its symbiotic relationship with soybean. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, 18:190-199. 1977.

VINCENT, J.M. Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. **Oxford, Blackwell**, 1970. 164p.

ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. 502 p.

ZILLI, J.É.; CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.3, p. 335-337, 2010a.

ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPOS, J. C.; ROUWS, J. R. C. HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online]. v. 34, n.6, p. 1875-1881,2010b.

ZORATO, M.; HENNING, A. Influência de tratamentos fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.23, n.2, p.236-244, 2001.