

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA**

**SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium elkanii* EM SEMENTES DE
SOJA SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE
PIRACLOSTROBINA + TIOFANATO-METÍLICO + FIPRONIL**

EDUARDO NEVES MROKOWSKI

**BRASÍLIA, DF
2019**

EDUARDO NEVES MROKOWSKI

**SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium elkanii* EM SEMENTES DE SOJA
SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE PIRACLOSTROBINA + TIOFANATO-
METÍLICO + FIPRONIL**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora:
PROF^a. DR^a. **ALESSANDRA MONTEIRO DE
PAULA**

**BRASÍLIA, DF
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

MSO677s Mrokowski, Eduardo Neves
Sobrevivência de *Bradyrhizobium elkanii* em sementes de soja submetidas a diferentes doses de piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil / Eduardo Neves Mrokowski; orientador Alessandra Monteiro de Paula. -- Brasília, 2019. 35 p.

Monografia (Graduação - Agronomia) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Tratamento químico de sementes . 2. Inoculantes. 3. Microbiologia do solo. 4. Leguminosas. I. Paula, Alessandra Monteiro de, orient. II. Título.

Cessão de direitos

Nome do Autor: Eduardo Neves Mrokowski

Título: Sobrevivência de *Bradyrhizobium elkanii* em sementes de soja submetidas a diferentes doses de piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil.

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desse relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

EDUARDO NEVES MROKOWSKI

SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium elkanii* EM SEMENTES DE SOJA SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE PIRACLOSTROBINA + TIOFANATO- METÍLICO + FIPRONIL.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em ____ de _____ de ____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Monteiro de Paula
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Orientador

Prof. Dr Carlos Roberto Spehar
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Examinador

Prof^a. Dr^a. Maria Lucrécia Gerosa Ramos
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço todas pessoas que passaram pela minha vida chegando neste momento tão importante de conclusão de curso.

A minha mãe Ana Beatriz que sempre me deu forças e teve bastante paciência comigo durante toda vida, ela que sempre deu o máximo para que eu fosse o melhor possível, abdicando de muita coisa para que eu chegasse onde estou, tornando esse momento possível.

Ao meu pai Everaldo, que teve paciência e sempre me provocou para que eu buscasse o melhor caminho dentro e fora da faculdade.

Minhas tias Débora e Jânia e aos meus tios Astor e Carlos, que me acolheram de forma incrível durante a graduação, que me deram um incentivo absurdo para que eu estudasse.

A toda minha família, que foi minha base e me deu todo apoio necessário, possibilitando chegar onde cheguei.

A todos os meus amigos, que foram de grande importância durante essa trajetória, em especial aos meninos do CS, que sempre reuniam e tornavam tudo mais engraçado.

A Isabela e a dona Márcia, que me acolheram demais, me dando muita força nos momentos mais difíceis.

A minha professora orientadora Alessandra Monteiro pelo apoio, incentivo e paciência durante a realização deste trabalho.

Por fim a todos os professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília pelo trabalho dedicado à minha formação acadêmica.

EPÍGRAFE

*O sucesso é ir de fracasso em fracasso
sem perder o entusiasmo.*

Winston Churchill

RESUMO

Sobrevivência de *Bradyrhizobium elkanii* em sementes de soja submetidas a diferentes doses de piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil.

A soja é uma cultura de grande importância para o Brasil e no Centro-Oeste é uma das principais culturas utilizadas no período da safra. Entretanto, devido a ampla diversidade de pragas que o produtor está sujeito no campo, o uso discriminado de produto químico no tratamento de sementes pode se fazer necessário para proteger a cultura de fungos, bactérias e insetos. Para se manter os altos níveis de produtividade nacional foi encontrada no uso de inoculantes o potencial diferencial na produção brasileira, gerando a redução de custos com fertilizantes químicos, e a capacidade de suprir a demanda nutricional de nitrogênio pela planta. O experimento foi conduzido na Universidade de Brasília – UnB teve como objetivo avaliar a taxa de germinação e a quantidade de rizóbios viáveis das sementes inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 – SEMIA 5019 na quantidade de 400 mg para 50kg de sementes em três diferentes doses de Standak Top® (Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil), 50mL, 100mL e 200mL para 100kg no tratamento de sementes de soja. Obtendo os resultados de germinação abaixo de 80% apenas para a dose de 200 mL para 100kg de sementes no experimento sem o uso de inoculantes e com germinação abaixo de 50% quando desinfestadas com álcool e hipoclorito de sódio e inoculadas. O número máximo de rizóbios viáveis foi determinado em $2,68 \times 10^5$ na testemunha e de $0,3 \times 10^5$ na dose de 200mL para 100kg de sementes.

Palavras-chave: Tratamento químico de sementes; fungicida; inseticida; standak top; rhizobium; bactérias promotoras de crescimento vegetal; ciclos biológicos; inoculação.

ABSTRACT

Viability of *Bradyrhizobium elkanii* in soybean seeds treated with different dosage of pyraclostrobin + thiophanate methyl + fipronil

Soybean is a crop of great importance to Brazil and in the Midwest is one of the main crops used in the harvest period. However, due the great diversity of pests that the producer to in the field, the proper use of chemical in the seed treatment may be necessary to protect the culture from fungi, bacteria and insects. To keep high levels of national productivity was founded in the use of inoculants the differential potential in the Brazilian production, Reducing the costs with chemical fertilizers, and keeping the capacity to fill the nutritional demand of nitrogen for the plant. The experiment was conducted in the University de Brasília – UnB evaluated germination rate and the quantity of viable rhizobia of inoculated seeds with the nitrogen fixing bacteria *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 – SEMIA 5019 in dosage 400 mg to 50 kg of seeds in three different treatment with Standak® Top (Pyraclostrobin + Thiophanate methyl + Fipronil), 50mL, 100mL and 200mL to 100kg in the seed treatment of soybean. Getting germination rates below 80% just for the treatment with the 200 mL of product to 100kg of soybean seeds dosage in the treatment without use of inoculants and germination rates below 50% when seeds were disinfected with alcohol and sodium hypochlorite and inoculated. The maximum number of viable rhizobia was 2.68×10^5 in the control and 0.3×10^5 in the dose of 200 mL for 100kg of soybean seeds.

Keywords: Chemical seed treatment; fungicide; pesticide; standak top; rhizobium; plant growth promoting bacteria; nitrogen fixing bacteria; biological cycles; inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Disposição das cinquenta sementes de soja em papel Germitest que foram colocadas em câmara BOD a 25°C por 7 dias para se analisar a taxa de germinação.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2: Sementes de soja dispostas em papel toalha para secagem após tratamento químico de sementes e inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 - SEMIA 5019**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3: Sementes observadas com dose de 200mL para 100 kg de sementes 7 dias após o tratamento, com baixa taxa de germinação26

Figura 4: Porcentagem de germinação de sementes de soja submetidas ao tratamento químico com produto comercial, contendo 3 princípios ativos de ação inseticida e fungicida, em 3 doses (0,5: 50 mL produto/100 kg sementes; 1: 100 mL produto/100 kg sementes; 2: 200 mL produto/100 kg sementes). Médias seguidas de mesma letra, não diferiram entre si, pelo teste t de Student ($p < 0,05$).....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5: Porcentagem de germinação de sementes de soja submetidas ao tratamento químico com produto comercial, contendo 3 princípios ativos de ação inseticida e fungicida, em 3 doses (0,5: 50 mL produto/100 kg sementes; 1: 100 mL produto/100 kg sementes; 2: 200 mL produto/100 kg sementes), seguidas de aplicação de inoculante turfoso contendo *Bradyrhizobium elkanii*. Médias seguidas de mesma letra, não diferiram entre si, pelo teste t de Student ($p < 0,05$).....28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
AGROSTAT	Estatística de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Soja no Brasil	16
3.2 Tratamento químico de sementes	17
3.3 Inoculantes comerciais e a sua aplicação na cultura da soja no Brasil.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Localização e condução do experimento	24
4.2 Condução do experimento	24
5.RESULTADOS	26
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) foi responsável pela criação de uma estrutura de produção altamente complexa, armazenamento, processamento e de comercialização em todos os países onde tem sido cultivada em larga escala.

A grande demanda no mercado internacional proporcionou rápida expansão dessa cultura no Brasil, que ocorreu pela adoção de áreas cultivadas com outras culturas e da expansão de novas fronteiras agrícolas.

A soja no Cerrado brasileiro proporcionou grande evolução em meados dos anos 1980, com a seleção e difusão de variedades adaptadas para essa região.

Essa expansão da fronteira agrícola foi de suma importância para que o Brasil se tornasse uma potência no cultivo desta cultura, sendo o segundo maior produtor mundial atualmente.

Atualmente com diversos avanços no manejo cultural e ampla disponibilidade de material genético adaptado, quase trinta anos depois, a nova expansão ocorre em três estados, Maranhão, Tocantins e Piauí. Em 2014 essa região foi responsável por quase 10% da produção nacional.

Um avanço considerável no êxito do cultivo foi a expansão do uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de capturar o N₂ da atmosfera e tornar assimilável pelas plantas. Pois a inoculação é a maneira mais eficaz de se fornecer nitrogênio para a soja, estimam que lavouras inoculadas apresentam aumento de rendimento em cerca de 8% em relação as que não são inoculadas, quando comparadas em áreas previamente inoculadas.

Como consequência são gerados benefícios econômicos e ambientais, pois essa prática torna o uso de adubação química de nitrogênio reduzida, resultando em economizando cerca de 8 bilhões de dólares. Ademais essa tecnologia contribui para o sequestro de carbono, diminuindo seu retorno para a atmosfera.

Para se precaver de doenças de solo, insetos e fungos, produtores tendem a tratar suas sementes com produtos químicos comerciais, pelo fato deste manejo ter um baixo custo e pode garantir um bom rendimento da lavoura, gerando certo conflito com inoculantes, tendo em vista que estes são organismos vivos.

Atualmente o Brasil produz cerca de 50 milhões de doses de inoculantes por ano, com evolução gradativa ao longo dos anos, demonstrando adoção da tecnologia por grande parte dos agricultores brasileiros, buscando maior rentabilidade das suas lavouras.

O principal fator limitante de produtividade são doenças causadas por fungos, bactérias e nematoides, estima-se perdas anuais de produção entre 15% e 20%, podendo chegar a 100% em alguns casos.

A presença destas doenças vem causando aumento no custo de produção, com uso de insumos e medidas fitossanitárias que reduzam os danos e as perdas causadas pelos agentes biológicos.

Diante deste contexto, prática rotineira é o tratamento de sementes, com produtos como: micronutrientes, biorreguladores, além de fungicidas e inseticidas. Estes últimos têm propósito de reduzir o inóculo de pragas associadas, assim como evitar a posterior infecção e também propiciar o controle de insetos-pragas iniciais na cultura. Neste contexto, o tratamento de sementes é utilizado com a finalidade de melhorar a porcentagem de germinação das sementes e o estabelecimento da cultura (PEREIRA et al., 2016).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a taxa de germinação de sementes inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 – SEMIA 5019 em sementes da cultivar SeedCoop HO Cristalino tratadas com Standak Top® (Piraclostrobina + Tiofanato-metílico + Fipronil) em diferentes doses. Assim como a taxa de sobrevivência dos rizóbios viáveis três horas após a inoculação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja no Brasil

A soja é uma planta pertencente à família das Fabaceae, denominada cientificamente *Glycine max* (L) Merrill, e compreende mais de 7000 variedades. O grão apresenta de 90 a 100% de nutrientes digestíveis totais, devido ao alto teor de óleo. (TONISSI et al, 2013).

Com origem no extremo Oriente, a soja é uma das oleaginosas mais cultivadas no mundo (EMBRAPA, 2011), sendo considerada base da alimentação de diversos povos. O seu cultivo expandiu no Brasil a partir da década de 60 (ZANCOPÉ et al., 2005).

A safra brasileira em 2018-2019 apresenta acréscimo na área plantada de 2.1% relativo a última safra, representando o plantio de 35,9 milhões de hectares produzindo 115 milhões de toneladas, sendo o segundo maior produtor mundial do grão, com uma produtividade média de 3.203 kg por hectare (CONAB, 2019).

Segundo o sistema AGROSTAT que responde as Estatísticas de comércio exterior do agronegócio brasileiro no ano de 2018 foram exportadas 111,3 milhões de toneladas de produtos derivados do complexo da soja, farelo de soja, óleo de soja e soja em grãos, para diversos países, correspondendo a uma entrada de capital de 40,7 bilhões de dólares, demonstrando tamanha importância para essa cultura em território nacional.

Estima-se que a fixação biológica de nitrogênio tenha uma contribuição global na agricultura estimada em 60 milhões de toneladas de nitrogênio por ano. No Brasil, o caso de maior sucesso é representado pela cultura da soja, onde o uso de inoculantes garantiu a competitividade para a mesma quando comparada com a produção de outros países. Com o processo de inoculação são economizados de R\$ 25 bilhões anuais em razão da não utilização de adubos nitrogenados. (EMBRAPA, 2019)

Potenciais limitantes para o aumento da produtividade são as pragas e doenças, algumas das principais pragas no Brasil: lagarta da soja (*Anticarsia*

gemmatalis), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta elasmopalpus (*Elasmopalpus lignosellus*), lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) e lagarta helicoverpa (*Helicoverpa spp.*), e doenças: antracnose (*Colletotrichum truncatum*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), mancha alva (*Corynespora cassiicola*), cancro da haste (*Phomopsis phaseoli f. sp. Meridionalis*) e a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*).

Atualmente a cultura da soja no Brasil ocupa a maioria das áreas com cultivos anuais. Essa expansão tem sido possibilitada devido aos programas de melhoramento genético associada aos avanços científicos e tecnológicos, onde se é possível obter cultivares altamente produtivas em baixas latitudes, conferindo o êxito da fixação biológica de nitrogênio, conferindo as características de estande desejáveis para a lavoura. (KRZYZANOWSKI et al., 2008). Associados com pacotes tecnológicos relacionados ao manejo do solo, calagem e adubação, manejo de pragas e doenças. (FREITAS, 2011)

A aplicação de inseticidas nas sementes e no sulco de semeaduras da soja representa uma das principais práticas eficazes para o controle de pragas que atacam as raízes. (ÁVILA; GOMÉZ, 2013)

3.2 Tratamento químico de sementes

O tratamento químico de sementes se tornou uma prática eficaz pelo fato de garantir um melhor estande de plantas, controlando importantes patógenos transmitidos pelas sementes. Em condições desfavoráveis, somados com deficiência hídrica a germinação e emergência das sementes do solo ocorre em um processo lento, expondo por mais tempo as sementes a pragas do solo, que podem causar sua deterioração ou morte da plântula. (KRZYZANOWSKI, 2006)

Esse tratamento age de forma preventiva, podendo ser feito nas propriedades ou de forma industrial, apresentando custo relativamente baixo e impacto ambiental reduzido quando comparados a defensivos agrícolas, levando em consideração a área reduzida de exposta ao produto. (DA CUNHA et al., 2015).

Atualmente existem 105 produtos registrados no MAPA para tratamento de sementes de soja (AGROFIT, 2019). Alguns produtos utilizados para este procedimento são: Cruiser® 350FS (tiametoxan), Avicta® 500 FS Pro (abamectina), Standak® Top (piraclostrobina + tiofanato-metilico + fipronil), Cropstar® (imidacloprido + tiodicarbe), Vitavax® Thiram 200 SC (carboxina + tiram), Avicta® (abamectina), Maxim® XL (metalaxy-M + fludioxonil), demonstrando a ampla gama de produtos e ingredientes ativos disponíveis para diferentes pragas, fungos, insetos e nematóides. A classificação toxicológica e grupo químico dos produtos estão detalhados conforme Tabela 1.

Tabela 1: Produtos para tratamento de sementes detalhados por classificação toxicológica e grupos químicos. Fonte: AGROFIT

Produto comercial	Classificação toxicológica	Grupo químico
Cruiser® 350FS	Classe III Medianamente tóxico	Neonicotinóide
Avicta® 500 FS Pro	Classe I Extremamente tóxico	Avermectina
Standak® Top	Classe II Altamente tóxico	Estrubirulina + benzimidazol + pirazol
Cropstar®	Classe II Altamente tóxico	Neonicotinóide + metilcarbamato de oxima
Vitavax® Thiram 200 SC	Classe I Extremamente tóxico	Carboxina + dimetilditiocarbamato
Maxim® XL	Classe III Medianamente tóxico	Fenilpirrol + acilalaninato

Desses produtos utilizados para o tratamento de sementes (tabela 1), observa-se uma variação entre as classes medianamente a extremamente tóxico.

A função do tratamento químico de sementes é proteger a semente contra fungos e pragas do solo. Portanto o tratamento de sementes, a aplicação de micronutrientes e a inoculação podem ser feitos de forma sequencial em máquinas específicas, contendo tanques separados para os produtos, evitando a mistura de produtos. Apresentando uma menor chance de intoxicação dos operadores pois os

produtos aplicados são de forma líquida. Atualmente existem máquinas para tratamento industrial capazes de tratar até treze toneladas de sementes por hora. (HENNING, 2005)

O uso dos produtos para tratamento de sementes de soja é influenciado por uma série de fatores, como histórico da área, o tipo de manejo, cultura anterior e pragas e doenças identificadas na área de cultivo, o manejo integrado de pragas consiste em não utilizar apenas um método isolado de controle, utilizando conjuntamente uma adubação equilibrada, uso de cultivares resistentes e rotação de culturas. (GOULART, 1998)

O produto selecionado para este experimento foi o Standak® Top (piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil), com seus ingredientes ativos participando da classe dos fungicidas e inseticidas de ação protetora, sistêmico, de contato e de ingestão. Com seus alvos biológicos para a cultura da soja. (Tabela 2.)

Tabela 2: Alvos biológicos para a cultura da soja do produto comercial selecionado para o experimento. Fonte: Bula do Standak® Top.

Nome comum	Nome científico	Reino
Fungo do armazenamento	<i>Aspergillus flavus</i>	Fungi
Mancha púrpura da semente	<i>Cercospora kikuchii</i>	Fungi
Antracnose	<i>Colletotrichum dematium</i> var. <i>truncata</i>	Fungi
Podridão do fusarium	<i>Fusarium semitectum</i>	Fungi
Cancro da haste	<i>Phomopsis phaseoli</i> f. <i>sp. Meridionalis</i>	Fungi
Phomopsis da semente	<i>Phomopsis sojae</i>	Fungi
Torrãozinho	<i>Aracanthus mourei</i>	Animalia
Vaquinha verde e amarela	<i>Diabrotica speciosa</i>	Animalia
Lagarta elasma	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Animalia
Piolho de cobra	<i>Julus hesperus</i>	Animalia

Coró	<i>Lyogenis suturalis</i>	<i>Animalia</i>
Coró	<i>Phyllophaga cuyabana</i>	<i>Animalia</i>
Tamanduá da soja	<i>Sternechus subsignatus</i>	<i>Animalia</i>

Foi realizado experimento utilizando o mesmo produto comercial em sementes de soja foi testado para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* sendo aplicado no tratamento de sementes utilizando a dose recomendada, o produto foi capaz de apresentar um dos melhores resultados em estande de plantas, estatura de plantas, incidência da doença, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e peso de mil sementes. (SPONCHADO et al.,2019.)

O tratamento químico apresenta como vantagem a redução de perdas pela incidência de pragas, porém pode causar problemas graves como a redução da produtividade e problemas com bactérias fixadoras de nitrogênio. (CAMPO; HUNGRIA, 2000)

O tratamento de sementes são práticas comuns na prevenção de danos causados por fungos, porém com capacidade de prejudicar a fixação de nitrogênio por *Bradyrhizobium*, pois este microorganismo pode sofrer toxidez com o defensivo agrícola, podendo inviabilizar a nodulação. (ANDRÉS, et al., 1998).

Avaliações laboratoriais verificaram reduções de até 98% na população de *Bradyrhizobium* quando as sementes são tratadas com produtos não tolerados, indicando a alta sensibilidade do microorganismo. (HUNGRIA et al., 2007).

3.3 Inoculantes comerciais e a sua aplicação na cultura da soja no Brasil

Os inoculantes são definidos, segundo a Instrução Normativa N° 13 de 24 de março de 2011, como “os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas que deverão apresentar concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, mantendo a garantia registrada até a data de seu vencimento (MAPA, 2011)

A fixação biológica realizadas por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foi uma das facilitadoras do cultivo em larga escala no Brasil. As bactérias simbióticas

quando em contato com as raízes da soja as infectam via pelos radiculares, gerando nodulações. Esse processo resulta na transformação do N_2 em amônia (NH_3), intermediado pela enzima dinitrogenase. (DA SILVA et al., 2011)

O nitrogênio corresponde a 78% da atmosfera, portanto é o nutriente em maior quantidade na atmosfera terrestre, sendo requerido em maior quantidade pela cultura da soja, pois é responsável por várias reações, fazendo parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. (FAGAN et al., 2007.) Além disso os grãos são ricos em proteínas, apresentando teor médio de 6,5% de N. (HUNGRIA et al., 2001).

A quantidade de nitrogênio incluso na matéria orgânica no solo é limitada, podendo se tornar escasso após sucessivos cultivos sem reposição. Além disso o clima brasileiro acelera os processos de decomposição da matéria orgânica, juntamente com o nitrogênio. Portanto, se torna de suma importância a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio, aumentando a viabilidade do mesmo para a soja. (HUNGRIA et al., 2001).

O Brasil é o caso de maior sucesso no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, pois a utilização de *Bradyrhizobium* possibilita uma economia anual de US\$ 3 bilhões, em fertilizantes nitrogenados. (HUNGRIA et al., 2005)

O Brasil ocupa posição de destaque no domínio das práticas científicas combinadas na produção de inoculantes. Essa posição foi conquistada após anos de pesquisas científicas voltadas para o melhor aproveitamento do clima tropical e pela grande diversidade biológica do país (SILVEIRA et al, 2005).

Assim como se selecionam plantas e animais por suas características produtivas, é realizado um trabalho de seleção e avaliação de estirpes de bactérias mais eficientes no estabelecimento e funcionamento da simbiose, a fim de incorporá-las ao inoculante. Experimentos com as estirpes com melhores produtividades são submetidas a testes de campo em diversas regiões do Brasil. Centros de pesquisa como a Embrapa Soja, a Embrapa Cerrado, a Embrapa Agrobiologia, a Embrapa Centro-Oeste, a FEPAGRO e o IAC, fazem parte desta rede de testes. (DA SILVA JUNIOR et al., 2019).

A aplicação tradicional via semente pode ser deficitária por conta da ação conjunta do rizóbio com fungicidas, inseticidas e micronutrientes, que colaboram para causar toxidez às bactérias, podendo ocasionar danos irreversíveis para as sementes. (VARGAS; SUHET, 1980)

Vem sendo divulgado devido ao aumento da produção de soja a técnica de aplicação de rizóbio pulverizado no sulco de semeadura, durante o plantio (ZHANG; SMITH, 1996). Outra forma de manejo pode ser o uso de altas doses de inoculantes, para evitar o contato direto do tratamento químico e micronutrientes com as sementes aumentando o número de rizóbios viáveis, que será fundamental para a fixação biológica de nitrogênio (JENSEN, 1987)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Localização e condução do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade de Brasília, nos laboratórios de Tecnologia de Sementes, Microbiologia e Bioquímica do Solo, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

4.2 Condução do experimento

A cultivar de soja selecionada para este experimento foi a SeedCoop HO Cristalino IPRO®, com a tecnologia Intacta RR2 Pro®, que apresenta resistência ao acamamento e o sistema radicular vigoroso, porém é susceptível ao cancro da haste, a mancha olho de rã e a mancha alvo, comercializada pela empresa Sementes Produtiva.

O experimento foi conduzido em duas etapas: primeiro ensaio consistiu em analisar as alterações da taxa de germinação das sementes com a aplicação de doses de tratamento químico com produto comercial contendo os princípios ativos: Piraclostrobina + Tiofanato-metílico + Fipronil e foi realizado um segundo ensaio para avaliar a taxa de germinação e o número de rizóbios viáveis após três horas de aplicação do *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 – SEMIA 5019, na quantidade de 400 mg de inoculante turfoso para 50kg de sementes, tratadas com doses do produto comercial contendo os princípios ativos: (Piraclostrobina + Tiofanato-metílico + Fipronil).

No primeiro ensaio, o teste de germinação as sementes (BRASIL, 2009) foram colocadas 50 sementes em cada tratamento (Figura 1) com 4 repetições, foram analisados 4 tratamentos diferentes: testemunha (T_0), meia dose recomendada de Standak® Top (50 mL/100 kg de sementes) + *Bradyrhizobium elkanii* ($T_{1/2}$), dose recomendada de Standak® Top (100 mL/100 kg de sementes) + *Bradyrhizobium elkanii* (T_1) e duas vezes a dose recomendada de Standak® Top (200 mL/100 kg de sementes). Para determinar a taxa de germinação das plântulas.



Figura 1. Disposição das cinquenta sementes de soja em papel Germitest que foram colocadas em câmara BOD a 25°C por 7 dias para se analisar a taxa de germinação.

Para o segundo ensaio as sementes foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio na concentração de 5% na intenção de retirar qualquer inóculo que não fosse o desejado. Após as sementes secarem, foram aplicados os tratamentos, semelhante ao primeiro ensaio e, com as sementes secas, foram aplicados 400 mg de inoculante para 50kg de sementes, contendo 10^8 UFC g^{-1} produto, com a estirpe *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 - SEMIA 5019 (Figura 2).



Figura 2. Sementes de soja dispostas em papel toalha para secagem após tratamento químico de sementes e inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* BR 20 - SEMIA 5019.

A análise do teste de germinação foi feita levando em consideração a quantidade de sementes germinadas (Figura 3).

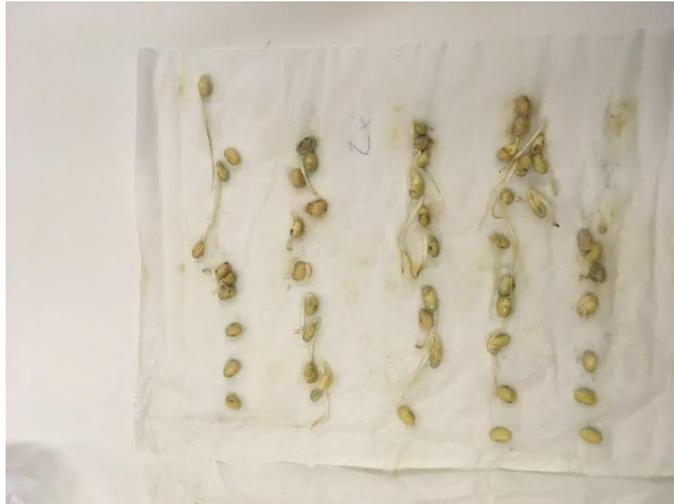


Figura 3. Sementes observadas com dose de 200 mL para 100 kg de sementes 7 dias após o tratamento, com baixa taxa de germinação.

Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância da significância pelo teste F, as e os parâmetros comparados pelo teste t de Student ($p < 0,05$), com auxílio do software SISVAR.

A análise do número de rizóbios viáveis foi conduzida de acordo com metodologia descrita por Andrade e Hamakawa (1994). Para cada tratamento pesou-se 10g de sementes inoculadas com rizóbios após três horas, posteriormente foram colocadas em 90 mL de solução salina 0,9% (NaCl), e agitadas por quinze minutos a 250 RPM. Em seguida, procedeu-se a diluição seriada em câmara de fluxo laminar até a diluição 10^{-8} . Alíquotas de 100 μL das diluições 10^{-8} a 10^{-3} foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio YMA sólido em triplicata para cada diluição, após a inoculação as placas foram incubas em câmara BOD por 7 dias a 28°C . A estimativa da densidade de células viáveis de rizóbios para cada tratamento baseou-se na estimativa do número mais provável, expressa em células por grama de semente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento de sementes de soja com apenas o produto químico comercial, composto de 3 princípios ativos de ação inseticida e fungicida, promoveu a redução da germinação de sementes, com a aplicação de até o dobro da dose recomendada, variando de 91% (tratamento controle) a 76,5% (200mL de produto/100 kg de sementes), conforme a Figura 4.

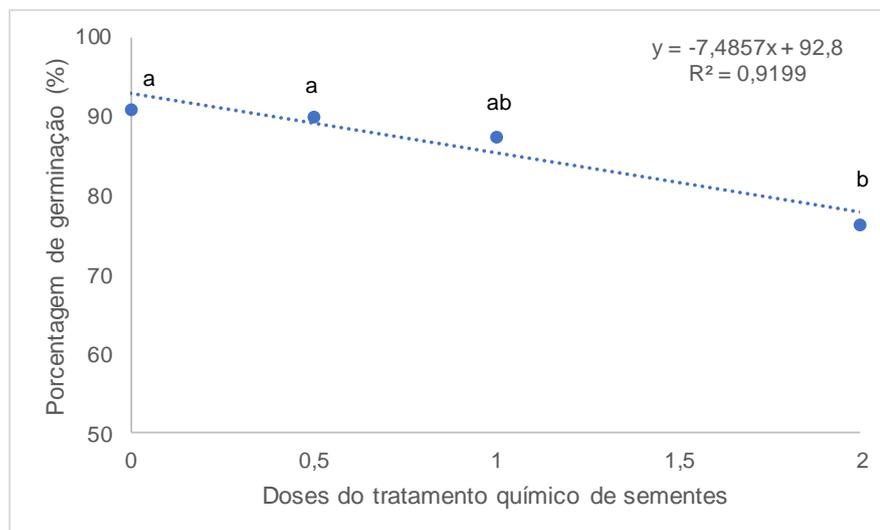


Figura 4. Porcentagem de germinação de sementes de soja submetidas ao tratamento químico com produto comercial, contendo 3 princípios ativos de ação inseticida e fungicida, em 3 doses (0,5 - 50 mL produto/100 kg sementes; 1 - 100 mL produto/100 kg sementes; 2 - 200 mL produto/100 kg sementes). Médias seguidas de mesma letra, não diferiram entre si, pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

Embora a aplicação de até o dobro da dose recomendada tenha promovido uma redução significativa de cerca de 16% na taxa de germinação de sementes de soja, a aplicação da dose recomendada (1 - 100 mL produto/100 kg sementes) não resultou em diferença na porcentagem de germinação das sementes (87,5%), em comparação ao controle (91%). Esse resultado indica que ao seguir as indicações do fabricante e, fazendo uso da dose recomendada, não há interferência do produto no potencial de germinação das sementes.

No segundo ensaio, conduzido para avaliar a influência do tratamento de sementes com o produto comercial composto de princípios ativos de ação inseticida e fungicida, sobre a sobrevivência de *Bradyrhizobium elkanii*, também foi avaliado o potencial de germinação das sementes (Figura 5).

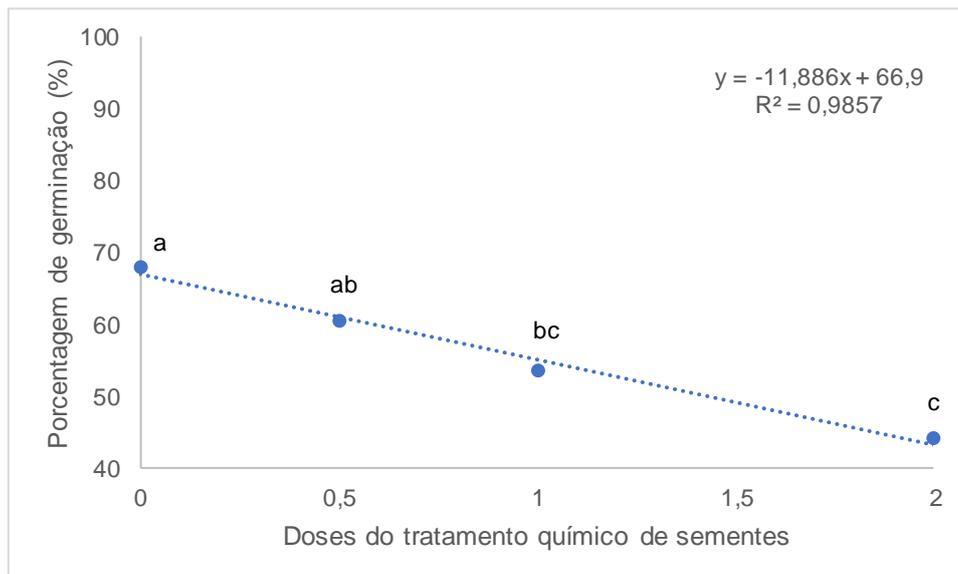


Figura 5. Porcentagem de germinação de sementes de soja submetidas ao tratamento químico com produto comercial, contendo 3 princípios ativos de ação inseticida e fungicida, em 3 doses (0,5 - 50 mL produto/100 kg sementes; 1 - 100 mL produto/100 kg sementes; 2 - 200 mL produto/100 kg sementes), seguidas de aplicação de inoculante turfoso contendo *Bradyrhizobium elkanii*. Médias seguidas de mesma letra, não diferiram entre si, pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

Neste ensaio, a porcentagem de germinação apresentou um comportamento semelhante ao observado no primeiro ensaio, apenas com a aplicação do tratamento químico das sementes. Entretanto, verificou-se um percentual de germinação bem inferior ao constatado no primeiro ensaio, com valores variando de 68% (tratamento controle) a 44% (dobro da dose recomendada de produto para o tratamento de semtes). Esses resultados tem relação direta com o procedimento de desinfestação das sementes de soja, realizado previamente a aplicação do tratamento de sementes, para garantir a ausência de outros microrganismos ou

outras espécies de rizóbios que eventualmente estivessem aderidos na superfície das sementes e, conseqüentemente, pudessem resultar na contagem equivocada da sobrevivência de rizóbios introduzidos pela inoculação, após o contato com o tratamento de sementes.

A aplicação da dose recomendada do tratamento de sementes de soja resultou em uma redução significativa de cerca de 21% da porcentagem de germinação (53,5%), em comparação ao tratamento controle, que recebeu a aplicação de inoculante turfoso contendo *Bradyrhizobium elkanii* (68%). Ao aplicar o dobro da dose recomendada para o tratamento de sementes (200 mL produto/ 100 kg sementes), constatou-se uma redução significativa de cerca de 35% na porcentagem de germinação (44%), em relação ao tratamento controle (68%).

O teste de sobrevivência dos rizóbios obteve os seguintes dados, com um número mais provável de rizóbios apresentando uma perda significativa quando comparado o a testemunha e o tratamento que apresenta 200 mL/100 kg de sementes tratadas com produto químico.

Tabela 2: Resultados do número mais provável de rizóbios com a confiança de 90% feitos em material contendo solução salina e solução das sementes diluídos em 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} após 7 dias de incubação. (T₀: Testemunha; T_{1/2}: 50 mL/100 kg de sementes de Standak® Top + *Bradyrhizobium elkanii*; T₁: 100 mL/100 kg de sementes de Standak® Top + *Bradyrhizobium elkanii*; T₂: 200 mL/100 kg de sementes de Standak® Top + *Bradyrhizobium elkanii*.)

Tratamento	T ₀	T _{1/2}	T ₁	T ₂
Nº mais provável de rizóbios	2,68 x 10 ⁵	0,317 x 10 ⁵	0,611 x 10 ⁵	0,3 x 10 ⁵

Na comparação entre os diferentes tratamentos após dentro do tempo de três horas, observou-se que as sementes tratadas com produto químico comercial contendo piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil apresentaram redução no número de rizóbios viáveis em comparação com a testemunha.

Quando comparado com Neto et al. (2014) que utilizou um produto com os mesmos ingredientes ativos na dose 100 mL para 100 kg de sementes, obteve $1,53 \times 10^5$ rizóbios viáveis, enquanto neste trabalho foi observado $0,611 \times 10^5$, um valor abaixo do que a testemunha ($2,68 \times 10^5$). Estes resultados estão coesos com Campo et al (2009), que descrevem que muitos fungicidas são capazes de causar a morte de quase 100% das bactérias inoculadas às sementes de soja. As características dos princípios ativos dos produtos utilizados no tratamento de sementes podem influenciar numa maior ou menor sobrevivência dos rizóbios (DENARDIN et al. 2005).

Visando a redução do efeito deletério do tratamento químico de sementes no número de células viáveis de rizóbios, é viável que se aumente a dose do inoculante nas sementes ou se faça a aplicação do inoculante no sulco da planta no momento do plantio. De acordo com dados de Richetti (2019), o gasto com inoculantes representa em média 0,17% do custo total da implantação de 1 hectare, portanto seu aumento não terá custo significativa, podendo representar ganhos em produtividade. Ainda, a tecnologia de inoculação via sulco de semeadura é uma estratégia de manejo que vem crescendo nos últimos anos (ANPII, 2019).

6. CONCLUSÕES

O teste de germinação foi feito com sementes inoculadas e não inoculadas, justificando sua baixa taxa no teste das sementes inoculadas pela desinfestação das sementes de soja, onde as sementes foram expostas a uma severa limpeza com álcool e hipoclorito de sódio.

O tratamento de sementes com a dose recomendada não interferiu diretamente no rendimento de germinação. Tornando-se limitante quando aplicado acima da dose de 100 mL de produto comercial para 100 kg de semente de soja.

A sobrevivência do *Bradyrhizobium elkanii* (BR 20 – SEMIA 5019) inoculado nas sementes de soja foi prejudicada quando submetidas a doses de tratamento químico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. S.; Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA Arroz e Feijão. 1994. 61-94

ANDRÉS J.A. et al. 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.140-146, 1998.

ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. Estatísticas. Disponível em:< <http://www.anpii.org/estatisticas>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

ÁVILA, C. J.; GOMÉZ, S. A. **Efeito de inseticidas aplicados nas sementes e no sulco de semeadura, na presença de coró-da-soja, *Phyllophaga cuyabana***. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2003. 28 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 55).

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária Instrução Normativa Nº 13, De 24 De Março de 2011.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretário de Defesa Agropecuária. Lei Nº 6.934, de 13 julho de 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009

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, n. 1, p. 154-163, 2009.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Safras, Evolução e estimativa. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/safra-evolucao-dashboard>>. Acesso em: 22 out. 2019

DA CUNHA, Ricardo Pereira et al. Diferentes tratamentos de sementes sobre o desenvolvimento de plantas de soja. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1761-1767, 2015.

DA SILVA, Amilton Ferreira et al. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, 2011.

DA SILVA JUNIOR, Jaim José et al. Impacto Econômico dos Inoculantes na Soja: Uma Análise Insumo-Produto. **Revista de Estudos Sociais**, [S.l.], v. 21, n. 42, p. 99-121, aug. 2019.

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, p. 166, 2005

DE REZENDE, Pedro Milanez; DE ARRUDA CARVALHO, Eudes. **Avaliação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] para o sul de Minas Gerais**. Ciênc. agrotec., v. 31, n. 6, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fixação biológica de nitrogênio. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>. Acesso em 02 dez 2019

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2012 e 2013**. Embrapa Soja. Londrina, 2011.

FAGAN, Evandro Binotto et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja- Revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S.A. **Yest Extract - Mannitol Agar Laboratory Manual of General Microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145p.

FREITAS, M. **A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola.** 2011. 12 p. Monografia (Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

GOULART, Augusto César Pereira. Tratamento de sementes de soja com fungicidas: recomendações técnicas. **Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1998.

HENNING, Ademir Assis. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2005.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília, DF: EMBRAPA Arroz e Feijão. 542 p. 1994.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., MENDES, I. C. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. Londrina: **Embrapa Soja, 2001**, 48p. (Circular Técnica, ISSN 1516-7860; n. 35)

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment.** Dordrecht: Springer, 2005. p.25-42.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J. **A importância do Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio para a Cultura da Soja:** (Documento 283). Componente Essencial Para a Competitividade do Produto Brasileiro. Londrina, Embrapa Soja, 80 p., 2007.

JENSEN, E.S. **Inoculation of pea by application of Rhizobium in the planting furrow.** Plant Soil, 97:63-70, 1987.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. **A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades.** Série 48 sementes. Londrina: EMBRAPA - CNPSo, 2008.

KRZYŻANOWSKI, F. C. et al. Tecnologias que valorizam a semente de soja. **Seed News**, n. 6, p. 1-2, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 13, de 24/03/20011. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

MEDEIROS, José George Ferreira et al. Controle de fungos e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max L.*) submetidas ao calor húmido. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 464-471, 2019.

PEREIRA, C. L., GARCIA, M. M., BRACCINI, A. L., PIANA, S. C., FERRI, G. C., MATERA, T. C., FELBER, P. H., MARTELI, D. C. V. Efeito da adição de biorregulador ao tratamento industrial sobre a qualidade de sementes de soja (*Glycine max (L.) Merr.*) aos sessenta dias de armazenamento convencional. **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**. v. 3, nº 1, p. 15-22, nov. 2016.

RICHETTI, A. Viabilidade econômica da cultura da soja para a safra 2019/2020, na região do centro-sul de Mato Grosso do Sul. Dourados: EMBRAPA. Comunicado Técnico 251. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/200260/1/COT-251-2019.pdf>> acesso em: 07 dez. 2019

SILVEIRA, José Maria Ferreira Jardim da; BORGES, Izaias de Carvalho; BUAINAIN, Antonio Márcio. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19, n. 2, p. 101-114, 2005.

SPONCHIADO, Julhana Cristina et al. TRATAMENTO DE SEMENTES NA CULTURA DA SOJA E SEUS EFEITOS NO CONTROLE DE SCLEROTINIA SCLEROTIORUM E NA PRODUTIVIDADE DE GRÃOS. **Seminário de Iniciação Científica, Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e Mostra Universitária**, p. e22046-e22046, 2019.

TONISSI, H. R.; GOES, B.; SILVA, X. H. L.; SOUZA, A. K.; **Alimentos e Alimentação Animal**. Universidade Federal da Grande Dourados: Ed. da UFGD, 2013.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Efeitos da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja em um solo de cerrado.; Effects of inoculation and water deficit on soybean development on a cerrado soil. 1980.

ZANCOPÉ, G. J.; NASSER, J. M.; MORAES, E. M. V. P. **O Brasil que deu certo: A saga da soja brasileira**. Triade. Curitiba, 2005.

ZHANG, Feng; SMITH, Donald L. Inoculation of soybean (*Glycine max.*(L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. **Plant and Soil**, v. 179, n. 2, p. 233-241, 1996.