

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE BRADIRRIZÓBIOS EM SEMENTES  
DE SOJA TRATADAS COM FUNGICIDAS, PROTETOR CELULAR  
“POWER” E O INOCULANTE “NITRAGIN OPTIMIZE”**

Bettina Berquó Marks

**PORTO ALEGRE**  
**NOVEMBRO/2008**

**BETTINA BERQUÓ MARKS**

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE BRADIRRIZÓBIOS EM SEMENTES  
DE SOJA TRATADAS COM FUNGICIDAS, PROTETOR CELULAR  
“POWER” E O INOCULANTE “NITRAGIN OPTIMIZE”**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção de grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas  
Orientador: Phd. Sueli Van Der Sand  
Co-orientador: MSc. Eliane Villamil Bangel

**PORTO ALEGRE  
NOVEMBRO/2008**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Sueli Van Der Sand pela orientação e disponibilidade;

À empresa Nitragin, pelo patrocínio do projeto e doação dos insumos;

À Eliane Bangel, por sua ajuda, orientação, amizade e solicitude, que tornou possível a realização deste trabalho;

À Vanessa Tedesco, pelo apoio na compilação de dados e análises estatísticas, além das boas conversas e risadas;

Aos colegas do Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio, Rafa, Pâ, Jú, Sil e Baiano, pela amizade e apoio;

À Laura Berquó e Daniela Grandi, minha mãe e minha irmã, pelo apoio e carinho nas horas difíceis;

Ao meu namorado Matheus, por todo amor e compreensão;

Às minhas amigas Taíse Otero, Ludmila Flores e Luciana Weiler, pelas conversas descontraídas e apoio incondicional;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do curso de Ciências Biológicas.

## RESUMO

O Brasil é considerado o segundo maior produtor de soja do mundo, e ocupa o primeiro lugar em exportação desse grão. A aplicação de técnicas agrícolas modernas tem grande importância no alcance e manutenção desse patamar. Entre essas técnicas destacam-se o surgimento do inoculante, o tratamento de sementes com fungicida e a adubação de micronutrientes via semente. Atualmente as sementes de soja veiculam fungicida, micronutriente e inoculante. Entretanto, estudos já realizados demonstraram incompatibilidade entre as bactérias inoculadas com as demais práticas de tratamento de sementes. Em função disso, algumas indústrias elaboraram aditivos celulares, que aumentariam a sobrevivência de microorganismos inoculados nas sementes, mesmo em presença de fungicidas e micronutriente. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do aditivo celular “Power” na sobrevivência de bradirrizóbios presentes no inoculante “Nitragin Optimize”, e a taxa de nodulação em sementes tratadas com fungicidas. O ensaio foi conduzido no Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio (LFBN) da FEPAGRO e na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Sementes de soja foram tratadas com quatro tipos de fungicidas (“Protreat 2” (PT2), “Vitavax-Thiram” (VT), “Derosal Plus” (DP) e “Maxim XL” (MXL)), com ou sem aditivo celular “Power” (PW) e com o inoculante “Nitragin Optimize”, constituindo os seguintes tratamentos: T1: somente inoculante; T2: inoculante + fungicida PT2; T3: inoculante + fungicida PT2 + aditivo PW; T4: inoculante + fungicida VT; T5: inoculante + fungicida VT + aditivo PW; T6: inoculante + fungicida DP; T7: inoculante + fungicida DP + aditivo PW; T8: inoculante + fungicida MXL e T9: inoculante + fungicida MXL + aditivo PW. A sobrevivência das bactérias foi avaliada em três períodos pós-inoculação: 4, 24 e 48 horas. No período de 24 horas, as sementes tratadas foram plantadas em casa de vegetação e após 25 dias de germinação, as raízes foram retiradas e tiveram seu peso seco e número de nódulos analisados. Os resultados do teste de sobrevivência demonstraram que o número de células de bradirrizóbio foi menor nos tratamentos que não receberam aditivo. O fungicida DP apresentou-se como o mais prejudicial à sobrevivência do microorganismo, enquanto o fungicida MXL foi o de menor efeito deletério ao microorganismo. O aditivo celular “Power” não demonstrou efeito benéfico em relação a número e peso seco de nódulos, assim como o efeito deletério dos fungicidas também não foi comprovado quanto a essas variáveis. Mais estudos são necessários para um maior esclarecimento acerca da eficácia do produto.

**Palavras-chave:** Inoculante, aditivo celular, fungicida, bradirrizóbio, FBN.

## ABSTRACT

Brazil is considered the second greater soybean producer in the world, and also has the first place in exportation of this kind of grain. The application of modern agricultural techniques has great importance in achieve and maintaining this place. Among these techniques it's eminent the use of inoculant, the seed treatment with fungicidal products and the manuring of micronutrients through the seed. Nowadays the soybean seeds carry fungicides, micronutrient and inoculant. Nevertheless, already done studies had demonstrated incompatibility between inoculated bacteria with the other seeds treatment practices. Because of that, some industries had created cells additives, which would enhance the concentration of inoculated microorganisms on the seeds, even if in the presence of fungicides and micronutrients. The present study had the objective of evaluate the effect of the "Power" cell additive on the on the surviving of inoculated bradyrhizobia with the "Nitragin Optimize" inoculant, and the nodulation tax in the fungicidal treated seeds. The essay was conducted on the FEPAGRO's Biological Nitrogen Fixation Laboratory (LFBN) and on the greenhouse of Agronomic Faculty from Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS). Soybean seeds were treated with four kinds of fungicides ("Protreat 2" (PT2), "Vitavax-Thiram" (VT), "Derosal Plus" (DP) and "Maxim XL" (MXL)), with or without the "Power" cell additive (PW) and with the "Nitragin Optimize" inoculant, constituting the following treatments: T1: inoculant only; T2: inoculant + PT2 fungicide; T3: inoculant + PT2 fungicide + PW additive; T4: inoculant + VT fungicide; T5: inoculant + V" T fungicide + PW additive; T6: inoculant + DP fungicide; T7: inoculant + DP fungicide + PW additive; T8: inoculant + MXL fungicide and T9: inoculant + MXL fungicide + PW additive. The bacterial surviving was avaliated in three different periods of time after inoculation: 4, 24 and 48 hours. At the 24 hours period, the treated seeds were planted in the greenhouse and after 25 germination days, the roots were removed and their weight and the nodules quantity analyzed. The surviving test results demonstrated that the cell number of bradirhizobes was smaller on the treatments with no additive. The fungicidal DP was the most prejudicious to the microorganism survival, while the fungicidal MXL had the lowest deleterious effect on the microorganisms. The "Power" cell additive had not demonstrated a beneficial effect on the number and dry weight of nodules, as well the deleterious effect of fungicides was also not been proved on such variables. More studies are necessary to clarify the product efficacy.

**Key Words:** Inoculant, cell additive, fungicide, bradyrhizobia, NBF.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tratamento de unidade experimental.....	17
FIGURA 2 - Acondicionamento das unidades experimentais.....	17
FIGURA 3 - Obtenção da diluição $10^0$ a partir de sementes tratadas.....	20
FIGURA 4 - Espalhamento das diluições em meio de cultura.....	20
FIGURA 5 - Plantio das sementes em casa de vegetação.....	22
FIGURA 6 - Vista geral do experimento em casa de vegetação.....	23
FIGURA 7 - Efeito dos tratamentos na sobrevivência do microrganismo nos três períodos de tempo analisados.....	28
FIGURA 8 - Média do número de nódulos nas raízes por tratamento.....	30
FIGURA 9 - Média do peso de nódulos nas raízes por tratamento.....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Formulações dos produtos utilizados.....	18
TABELA 2 - Solução de Vancomicina.....	21
TABELA 3 - Solução de Actidione.....	21
TABELA 4 - Composição do meio de cultura CRYMA.....	21
TABELA 5 - Número de UFC.sem. <sup>-1</sup> nos três períodos de tempo avaliados...	26
TABELA 6 - Avaliação comparativa do nº de UFC.sem. <sup>-1</sup> entre os tratamentos.....	27
TABELA 7 - Médias de UFC.sem. <sup>-1</sup> baseadas na diferença de tempo na inoculação.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

CRYMA – *Congo Red, Yeast, Mannitol, Agar*

DP – Derosal Plus

FBN – Fixação Biológica do Nitrogênio

FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

ha – Hectare

kg – Quilograma

LFBN – Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL - Mililitro

MXL – Maxim XL

N – Nitrogênio

PT2 – Protreat 2

sem – Semente

SENASA - *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VT – Vitavax – Thiram.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA EM LABORATÓRIO...19	
3.2 TESTE DE AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE MICRORGANISMOS NAS SEMENTES.....	25
4.2 ANÁLISE DA NODULAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	29
<b>4.2.1 NÚMERO DE NÓDULOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2 PESO SECO DE NÓDULOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse mundial na soja (*Glycine max*) é, em grande parte, devido ao elevado teor de proteína de seus grãos (cerca de 40%), constituindo importante fonte de alimentação tanto animal quanto humana (Crispino *et al.*, 2001). A manutenção do patamar de segundo maior produtor e exportador de soja do mundo tem sido realizado pelo Brasil através do aumento progressivo das áreas de cultivo, e também pela elevação da produtividade nas lavouras. Como fatores determinantes para isto são apontados, principalmente, a indexação do valor da oleaginosa e a aplicação intensiva de técnicas agrícolas modernas. Dentre essas técnicas, as práticas fitossanitárias e nutricionais vêm tendo papel preponderante para o atual quadro de participação da soja no mercado internacional.

Desde o advento do plantio direto na cultura desse grão, as práticas fitossanitárias têm evoluído no sentido da diminuição dos riscos de baixa produtividade e desenvolvimento de pragas de lavoura, e do aumento do retorno econômico, obtidos através de um padrão de lavoura que busque expressar o potencial genético de produção da soja. Dentre estas, destacam-se o surgimento do inoculante, o tratamento de sementes com fungicidas, e a adubação de micronutrientes via semente.

A inoculação é uma das práticas mais importantes no cultivo da soja. Isto se deve à necessidade da cultura em obter o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), um elemento essencial ao seu pleno crescimento e estabelecimento. Tal necessidade pode ser suprida através da simbiose de microrganismos do gênero *Bradyrhizobium* com as raízes da leguminosa. Os bradirrizóbios possuem a capacidade de romper a ligação tríplice do nitrogênio atmosférico e torná-lo assimilável para o vegetal como nitrogênio orgânico. Em troca, a planta oferece proteção dentro de suas raízes e compostos orgânicos, oriundos da fotossíntese, ao microrganismo. Esse processo é denominado Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). A inoculação tradicional consiste em transferir bradirrizóbios do produto inoculante para a superfície das sementes, que durante a germinação e desenvolvimento da plântula, irão infectar a mesma,

levando à formação de nódulos no sistema radicular, por onde a planta obterá o nitrogênio indispensável ao seu desenvolvimento.

Quanto maior o número de bactérias inoculadas na semente, maior a competição com as populações bacterianas já existentes no solo, resultando na formação de nódulos com as estirpes introduzidas pelo inoculante, as quais são comprovadamente mais eficientes no processo de FBN. Além disso, a presença de bactérias inoculadas favorece a formação de nódulos nas raízes principais e na coroa radicular, que são maiores e fixam maior quantidade de  $N_2$  do que os nódulos localizados nas raízes secundárias (Henning, 1997). Os inoculantes no Brasil são formulados com a combinação aleatória, duas a duas, das quatro estirpes recomendadas das espécies *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e espécies *B. elkanii*, SEMIA 587 e SEMIA 5019, consideradas as mais responsivas pela pesquisa brasileira e autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme Instrução Normativa nº 5, de 06 de agosto de 2004.

Para cada 1000 kg de soja produzidos, a planta necessita de 80 kg de N, em média (65 kg alocados nas sementes, tendo aproximadamente 40% de conteúdo protéico, e 15 kg alocados em raízes, caules e folhas). Sendo assim, para alcançar a média nacional de produção de 2737 kg.ha<sup>-1</sup> de soja, são necessários 220 kg N.ha<sup>-1</sup>. Os solos brasileiros são deficientes em N, suprindo a demanda em apenas 15-30 kg N.ha<sup>-1</sup>, restando uma deficiência de aproximadamente 200 kg N.ha<sup>-1</sup>, necessários ao pleno desenvolvimento da cultura de soja (Hungria *et al.*, 2005).

No Brasil, o cultivo de soja é recomendado com índice zero de fertilizante nitrogenado (Mercante *et al.*, 2007). Mesmo em solos com grandes quantidades de restos vegetais, não há efeito positivo da aplicação de N na produção de grãos, além de interferir negativamente na nodulação por bradirrizóbios (Henning, 1997). A eficiência da fertilização nitrogenada raramente alcança 60%, requerendo aproximadamente 330 kg.ha<sup>-1</sup> de N ou 710 kg.ha<sup>-1</sup> de uréia (46,64% de N) para alcançar o rendimento desejado. Com o preço do quilograma da uréia a US\$ 0,20, o custo da aplicação de fertilizantes nitrogenados chega, em média, a US\$ 142.ha<sup>-1</sup> (Hungria *et al.*, 2005). Quando se extrapolam tais custos para uma escala nacional, a adubação nitrogenada com uréia custaria anualmente, US\$ 3 bilhões para

suprir toda a área plantada de soja no Brasil (21 milhões de ha). Além disso, os fertilizantes nitrogenados têm um elevado custo ambiental, pois, em média, são gastos seis barris de petróleo para a síntese de uma tonelada de uréia (Crispino *et al.*, 2001). Segundo a FAO (1985), a taxa de FBN situa-se entre 60 e 220 kg de N.ha<sup>-1</sup> ao ano. Essa taxa seria suficiente para suprir as necessidades de nutrição nitrogenada da planta durante o ciclo de cultura, eliminando por completo a necessidade de adubação com uréia, evitando, também, efeitos negativos ao meio ambiente, devido ao processo de lixiviação de formas nitrogenadas, poluindo rios e lagos, e, por desnitrificação, afetando a camada de ozônio (DePolli & Franco, 1985; Campo & Hungria, 2000; Embrapa, 2001).

Com o desenvolvimento da tecnologia da inoculação, a produção de soja no Brasil tornou-se viável. O produtor economiza aproximadamente R\$ 460,00.ha<sup>-1</sup>, ou 57,5%, do valor de sua produção usando inoculantes ao invés de adubos nitrogenados. No Brasil, essa porcentagem significa uma economia de 5 bilhões de reais ao ano (Embrapa Soja, 2008). Em termos de porcentagem, a inoculação de sementes de soja representa acréscimos de rendimento de 4% a 15%, com custo em torno de 0,5% do custo de instalação da lavoura (Henning *et al.*, 1997).

Com o tempo, também se tornou imprescindível a necessidade do tratamento fitossanitário das sementes com fungicidas. A propagação de doenças fúngicas causadas por organismos como *Phomopsis* sp., *Cercospora* sp. e *Rhizoctonia solani*, causam prejuízos no rendimento e qualidade dos grãos (Henning, 1987). O tratamento com fungicidas via semente é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições edafoclimáticas, durante a semeadura, são desfavoráveis à germinação e à emergência da soja, deixando a semente exposta por mais tempo a fungos do solo (Henning *et al.*, 1997).

O uso intensivo do solo com a cultura de soja, e a falta de manejo adequado, têm provocado reduções dos teores de matéria orgânica e aumento da acidez do solo (Henning *et al.*, 1997). Em função disto, a aplicação de micronutrientes, exportados do solo durante a colheita dos grãos, é uma prática nutricional de extrema importância, sendo alguns desses micronutrientes indispensáveis à FBN, como Cobalto e Molibdênio.

Sendo assim, atualmente as sementes de soja veiculam fungicida, micronutriente e inoculante, numa seqüência de aplicação de fungicida e micronutriente de forma conjunta e anterior à prática da inoculação. Essa ordem de aplicação é necessária para garantir uma boa cobertura e aderência tanto do fungicida quanto do micronutriente, diminuindo assim, efeitos tóxicos sobre as células do bradirrizóbio (Henning *et al.*, 1997).

No entanto, vários estudos têm demonstrado incompatibilidade entre as bactérias inoculadas com as práticas do tratamento de sementes (Oliveira *et al.*, 1999; Guene *et al.*, 2003; Kyei-Boahen *et al.*, 2001). O uso cada vez mais intensivo de agrotóxicos (fungicidas, herbicidas e inseticidas) no cultivo da soja pode afetar as bactérias inoculadas e inibir a simbiose (Borges *et al.*, 1990). Muitos herbicidas diminuem o número, o tamanho e o peso seco de nódulos em raízes de soja (Dunigan *et al.*, 1972; Gaur, 1980)

Em função desta possível incompatibilidade dos microrganismos simbiotes com os fungicidas, surgiu a preocupação, por parte das indústrias fabricantes destes produtos, de testar a aplicação conjunta de fungicidas com inoculantes nas sementes de soja, a fim de verificar a sobrevivência do microrganismo e a viabilidade desta prática sem prejuízo à FBN.

Para maximizar a sobrevivência dos bradirrizóbios nas sementes, as pesquisas também foram direcionadas para a busca de formulações de produtos, chamados aditivos celulares, os quais garantiriam um aumento na viabilidade do microrganismo nas sementes. Esse aumento na taxa de sobrevivência das bactérias ocorreria em função da formulação do produto, com base lipídica e oligossacarídica, que proporcionaria um efeito osmoprotetor (redução do efeito da dessecação e favorecimento da manutenção do microambiente da semente) e antioxidante (redução do estresse oxidativo das membranas celulares e melhora da distribuição dos produtos sobre a semente). Estudos têm sido feitos para comprovar a eficácia de tais produtos, principalmente quando utilizados conjuntamente com fungicidas. Atualmente, a assistência técnica das empresas fabricantes recomenda para os agricultores a utilização conjunta de fungicidas, micronutrientes, inseticidas, aditivos celulares e inoculante para o tratamento de sementes de soja, sem uma comprovação do estudo de compatibilidade destes insumos.

Este estudo se propõe a comparar os efeitos das práticas de tratamento de sementes com fungicidas e aplicação conjunta de produto inoculante com ou sem aditivo celular, objetivando apontar resultados e possíveis necessidades de correções, tendo em vista serem práticas plenamente adotadas e em expansão que podem ter interferência na formação de nódulos e no rendimento da cultura.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a compatibilidade do uso conjunto de fungicidas, aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize” no tratamento de sementes de soja.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência de bradirrizóbios em sementes de soja tratadas com fungicidas, aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize” em diferentes períodos de tempo;
- Avaliar o efeito na nodulação de plantas de soja tratadas com fungicidas, aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize”.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas. A primeira, com o objetivo de testar a sobrevivência de bradirrizóbios na superfície das sementes em diferentes intervalos de tempo, conduzida no Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio (LFBN), da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO).

A segunda etapa constituiu os experimentos controlados para verificação da nodulação a partir das sementes tratadas. Estes foram conduzidos na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Sementes de soja da variedade RS10 foram tratadas com quatro tipos de fungicidas (“Protreat 2” (PT2), “Vitavax-Thiram” (VT), “Derosal Plus” (DP) e “Maxim XL” (MXL)), com aditivo celular “Power”, e com inoculante “Nitragin Optimize” contendo as estirpes SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), com garantia de concentração de  $1,5 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, constituindo os seguintes tratamentos:

T1 (Testemunha), sementes tratadas com o inoculante “Nitragin Optimize”;

T2 (Tratamento 2), sementes tratadas com o fungicida PT2 e inoculante “Nitragin Optimize”;

T3 (Tratamento 3), sementes tratadas com o fungicida PT2, adicionado do aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize”;

T4 (Tratamento 4), sementes tratadas com o fungicida VT e inoculante “Nitragin Optimize”;

T5 (Tratamento 5), sementes tratadas com o fungicida VT, adicionado do aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize”;

T6 (Tratamento 6), sementes tratadas com o fungicida DP e inoculante “Nitragin Optimize”;

T7 (Tratamento 7), sementes tratadas com o fungicida DP, adicionado do aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize”;

T8 (Tratamento 8), sementes tratadas com o fungicida MXL e inoculante “Nitragin Optimize”;



T9 (Tratamento 9), sementes tratadas com o fungicida MXL, adicionado do aditivo celular “Power” e inoculante “Nitragin Optimize”;

T10 (Tratamento 10), sementes sem tratamento (utilizado apenas na etapa de casa de vegetação).

Todos os produtos utilizados no experimento foram cedidos pela empresa Nitragin, e suas formulações podem ser vistas na Tabela 1. Os tratamentos (unidades experimentais) foram implantados de acordo com as dosagens dos produtos, segundo a recomendação técnica da indústria fabricante para tratar as sementes de soja:

- Inoculante Nitragin Optimize: 3 mL.kg<sup>-1</sup> ;
- Protetor Power: 0,7 mL.kg<sup>-1</sup> Power A + 0,7 mL.kg<sup>-1</sup> Power B;
- Protreat 2: 2 mL.kg<sup>-1</sup>;
- Maxim XL: 1 mL.kg<sup>-1</sup>;
- Vitavax-Thiram: 3 mL.kg<sup>-1</sup>;
- Derosal Plus: 2 mL.kg<sup>-1</sup>.

As misturas foram preparadas em um frasco com as quantidades necessárias para tratar quatro quilogramas (kg) de sementes e, após a homogeneização, foi retirada a quantidade específica para tratar um quilograma de semente para cada tratamento, de acordo com as dosagens recomendadas. Cada unidade experimental foi constituída de 1 kg de sementes de soja. As unidades foram colocadas em sacos plásticos para receberem o tratamento (Figura 1), e após quatro horas foram transferidas para sacos duplos de papel (Figura 2) e armazenadas em sala a temperatura ambiente de 28°C a 30 °C.

Também foi realizada a análise do produto inoculante seguindo a metodologia oficial do MAPA, para a averiguação da presença das cepas designadas no rótulo do produto e do número de UFC.mL<sup>-1</sup> assegurada pelo fabricante, e a verificação da possível presença de microrganismos contaminantes, através de diluições decimais seriadas até 10<sup>-7</sup> e contagem em placas, segundo Portaria SNDA nº 31 de 08 de junho de 1982.



**Tabela 1:** Formulações dos produtos utilizados no experimento

<b>Inoculante Optimize</b>	<b>Aditivo Celular Power</b>	<b>Fungicida Protreat 2</b>	<b>Fungicida Vitavax-Thiram</b>	<b>Fungicida Derosal Plus</b>	<b>Fungicida Maxim XL</b>
Cultura de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079	Ácido linoléico: 54,0%	Carbendazim: 15%	Carboxim: 20%	Carbendazim: 15%	Fludioxonil: 2,5%
Cultura de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019	Ácido oléico: 22,0%	Thiram: 35%	Thiram: 20%	Thiram: 35%	Metalaxyl-M: 1%
Água	Ácido palmítico: 11,0%	Umectantes, dispersantes, corantes e água: 100cc	Ingredientes inertes: 76,5%	Ingredientes inertes: 66,7%	Ingredientes inertes: 97%
Lipooligosacarídeos	Ácido linolênico: 7,5%				
	Ácido esteárico: 4,1% Isoflavonas, vitamina B, lecitina, ácido palmitoléico e ácido láurico: Traços				

### 3.1 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA EM LABORATÓRIO

A sobrevivência da bactéria nas sementes foi avaliada em três períodos de tempo após a execução do tratamento das sementes: 4 horas, 24 horas e 48 horas, através da recuperação dos bradirrizóbios na semente. De cada unidade experimental ( $T_1$  a  $T_9$ ) foram executadas três análises da sobrevivência da bactéria (A, B, C), em cada um dos três períodos de tempo, totalizando 81 análises. A metodologia de análise da recuperação das bactérias na semente baseou-se em diluições decimais seriadas e contagem em placas, de acordo com o protocolo de análise preconizado pela empresa contratante do estudo.

Para cada análise, 100 sementes de soja tratadas foram colocadas em Erlenmeyer, com 100 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), adicionado de 0,01% de Tween 80, produto que melhora a dispersão dos insumos nas sementes (Figura 3). A mistura ficou em agitação por 20 minutos, sendo considerada então, a diluição  $10^0$ . A partir da diluição  $10^0$  foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL de cada uma das quatro diluições foram inoculadas em placas de Petri, em três repetições. A solução foi espalhada utilizando alça de Drigalski (Figura 4) no meio com extrato de levedura e manitol com Vermelho Congo e ágar (CRYMA – *Congo Red, Yeast, Mannitol, Agar*), adicionado de 0,1 mL de uma solução de vancomicina [0,3mg] e 0,2 mL de solução actidione (cicloheximidina) [16 mg]. Esse meio de cultura é seletivo para o crescimento de bactérias Gram-negativas, como é o caso de *Bradirhizobium*. Além disso, esse gênero não absorve o corante Vermelho Congo, podendo ser diferenciado de contaminantes que o absorvem. As composições das soluções dos dois antimicrobianos e do meio de cultura podem ser vistas nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Os antimicrobianos foram adicionados ao meio de cultura para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes Gram positivos (vancomicina) e fungos (cicloheximidina). Após um breve período de absorção das alíquotas inoculadas (aproximadamente 10 minutos), as placas foram encaminhadas a uma estufa bacteriológica para incubação a 28°C, por um período de 7 a 12 dias.



**Tabela 2:** Solução de Vancomicina adicionada ao meio CRYMA.

Vancomicina	0,009g
Água destilada	3mL

**Tabela 3:** Solução de Actidione adicionada ao meio CRYMA.

Actidione	25mg
Álcool	0,3mL

**Tabela 4:** Composição do meio de cultura CRYMA (quantidades para preparo de 1 litro de meio de cultura).

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,1g
Manitol	10,0g
Extrato de Levedura	0,4g
Agar	10,0g
Água destilada	1L
Vermelho Congo	10mL

A avaliação da manifestação do crescimento dos bradimirizóbios foi realizada a partir do sexto dia após a inoculação, contando-se as unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de Petri para o cálculo do número de UFC por semente. As placas foram observadas até o décimo segundo dia de incubação. O cálculo utilizado para a estimativa do número de bactérias por semente, através da contagem de UFC crescidas nas placas após o cultivo, foi feito da seguinte maneira:

$$\text{UFC.sem.}^{-1} = \text{n}^{\circ} \text{ de UFC contadas na placa} \times \text{diluição na qual foi feita a contagem} \times 10 \text{ (fator de correção)}$$

O resultado da análise de sobrevivência para cada tratamento, em cada intervalo de tempo foram analisados estatisticamente pelo programa ASSISTAT<sup>®</sup>, através do teste de Tukey a 5%.

### 3.2 TESTE DE AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

As mesmas unidades experimentais constituídas para o teste de sobrevivência da bactéria na semente foram utilizadas para o plantio em casa de vegetação, adicionando-se mais um tratamento ( $T_{10}$ ), que não recebeu nenhum tipo de tratamento nas sementes (Testemunha Negativa).

De cada unidade experimental ( $T_1$  a  $T_{10}$ ), foi realizado o plantio em casa de vegetação no período de 24 horas após o tratamento das sementes, através do Método de Burton Modificado (Burton, 1978). Para cada unidade experimental foram implementadas sete bandejas, contendo sete copos plásticos de 500 mL com substrato esterilizado de areia e vermiculita, onde seis copos receberam uma semente tratada (Figura 5), e o sétimo copo (central) recebeu uma semente sem tratamento (testemunha negativa da bandeja –  $T_{10}$ ).



Vinte e cinco dias após a germinação (Figura 6), as plantas foram retiradas dos copos e tiveram suas raízes acondicionadas, separadamente, em sacos de papel devidamente identificados por tratamento e bandeja. Os sacos contendo as raízes foram então levados ao laboratório para avaliação da nodulação.



**Figura 6:** Vista geral do ensaio em casa de vegetação, após 25 dias do plantio.

O Método de Burton Modificado avalia a efetividade de um inoculante nas condições de uso recomendadas e leva em consideração a porcentagem de plantas noduladas. O método avalia a nodulação que ocorre em um cilindro imaginário, de dimensões 2,5cm x 2,5cm, na coroa da raiz da planta. Dentro da área desse cilindro imaginário, que inclui tanto raízes primárias quanto secundárias, a planta é considerada positiva quando possui três ou mais nódulos bem desenvolvidos, e negativa quando o número de nódulos é menor do que três. A metodologia prevê que deve obter-se, para a contagem final, no mínimo, 30 plantas corretamente estabelecidas e saudáveis para iniciar a avaliação. O tratamento é considerado satisfatório quando apresentar 80% de plantas positivas (noduladas). Assim sendo, as raízes das plantas de cada tratamento foram classificadas segundo esse método e avaliadas quanto ao



número e peso seco de nódulos na raiz primária e na raiz secundária de cada planta, para cada tratamento.

Os resultados da contagem e pesagem dos nódulos dos nove tratamentos constituídos de sementes tratadas foram analisados estatisticamente pelo programa ASSISTAT<sup>®</sup>, através do teste de Tukey a 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto inoculante “Nitragin Optimize” utilizado no ensaio, apresentou a concentração de  $8,2 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, ausência de microrganismos contaminantes na diluição  $10^{-5}$  e presença das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5019, atendendo às garantias declaradas.

### 4.1 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE MICRORGANISMOS NAS SEMENTES

Os resultados das contagens em placas em cada repetição, por tratamento em cada período de tempo, com suas respectivas médias estão apresentados na Tabela 5.

De acordo com as análises estatísticas obtidas neste estudo, o número de células de bradirrizóbio por semente foi menor nos tratamentos que receberam apenas os fungicidas e inoculante Nitragin Optimize (T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>), em comparação com os respectivos tratamentos que receberam o aditivo celular Power (T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>9</sub>), exceto para os tratamentos que receberam o fungicida Derosal Plus (T<sub>6</sub> e T<sub>7</sub>) (Tabela 6). Bueno e colaboradores (2003) testaram o efeito de fungicidas na sobrevivência e nodulação de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079), e obtiveram resultados *in vitro* que demonstraram um efeito negativo altamente significativo das combinações de fungicidas Carbendazim + Thiram (mesma formulação dos fungicidas Vitavax-Thiram e Derosal Plus) e Carboxim + Thiram (mesma formulação do fungicida Protreat 2), com as mesmas duas estirpes analisadas. Neste mesmo sentido, Campo e Hungria (1999), trabalhando com misturas de fungicidas, encontraram uma redução de 64% e 57%, 2 horas e 24 horas após a aplicação dos tratamentos, respectivamente, para Carbendazim + Thiram. Tedesco e Campos (2001), avaliando a sobrevivência de *Bradyrhizobium* na superfície de sementes de soja, verificaram efeito prejudicial do fungicida Protreat 2, o qual afetou a bactéria em todo o período de avaliação, que se estendeu por 14 dias após o tratamento das sementes.

**Tabela 5.** Número de UFC.sem.<sup>-1</sup> por repetição e respectiva média por tratamento, nos três períodos de tempo avaliados.

TRATAMENTOS	AVALIAÇÃO 4 HORAS			AVALIAÇÃO 24 HORAS			AVALIAÇÃO 48 HORAS		
	REP	UFC.SEM. <sup>-1</sup>	MÉDIA	REP	UFC.SEM. <sup>-1</sup>	MÉDIA	REP	UFC.SEM. <sup>-1</sup>	MÉDIA
T1 (Test. + inoculante)	A	2,89 x 10 <sup>5</sup>	3,12 x 10 <sup>5</sup>	A	1,22 x 10 <sup>5</sup>	1,87 x 10 <sup>5</sup>	A	5,60 x 10 <sup>4</sup>	4,61 x 10 <sup>4</sup>
	B	3,37 x 10 <sup>5</sup>		B	2,29 x 10 <sup>5</sup>		B	3,10 x 10 <sup>4</sup>	
	C	3,10 x 10 <sup>5</sup>		C	2,10 x 10 <sup>5</sup>		C	5,13 x 10 <sup>4</sup>	
T2 (PT2 + inoculante)	A	1,11 x 10 <sup>5</sup>	9,94 x 10 <sup>4</sup>	A	4,80 x 10 <sup>4</sup>	1,67 x 10 <sup>5</sup>	A	3,48 x 10 <sup>3</sup>	3,99 x 10 <sup>3</sup>
	B	7,53 x 10 <sup>4</sup>		B	1,96 x 10 <sup>5</sup>		B	3,93 x 10 <sup>3</sup>	
	C	1,12 x 10 <sup>5</sup>		C	2,57 x 10 <sup>5</sup>		C	4,56 x 10 <sup>3</sup>	
T3 (PT2 + Pw + inoculante)	A	2,90 x 10 <sup>5</sup>	3,03 x 10 <sup>5</sup>	A	2,43 x 10 <sup>5</sup>	2,33 x 10 <sup>5</sup>	A	1,12 x 10 <sup>5</sup>	9,71 x 10 <sup>4</sup>
	B	2,53 x 10 <sup>5</sup>		B	2,18 x 10 <sup>5</sup>		B	9,56 x 10 <sup>4</sup>	
	C	3,67 x 10 <sup>5</sup>		C	2,38 x 10 <sup>5</sup>		C	8,36 x 10 <sup>4</sup>	
T4 (VT+ inoculante)	A	7,07 x 10 <sup>4</sup>	9,37 x 10 <sup>4</sup>	A	3,17 x 10 <sup>4</sup>	3,96 x 10 <sup>4</sup>	A	2,23 x 10 <sup>3</sup>	2,93 x 10 <sup>3</sup>
	B	1,56 x 10 <sup>5</sup>		B	4,63 x 10 <sup>4</sup>		B	3,23 x 10 <sup>3</sup>	
	C	5,43 x 10 <sup>4</sup>		C	4,07 x 10 <sup>4</sup>		C	3,33 x 10 <sup>3</sup>	
T5 (VT + Pw + inoculante)	A	2,26 x 10 <sup>5</sup>	2,24 x 10 <sup>5</sup>	A	2,37 x 10 <sup>5</sup>	1,71 x 10 <sup>5</sup>	A	5,30 x 10 <sup>4</sup>	4,81 x 10 <sup>4</sup>
	B	1,98 x 10 <sup>5</sup>		B	1,21 x 10 <sup>5</sup>		B	4,80 x 10 <sup>4</sup>	
	C	2,48 x 10 <sup>5</sup>		C	1,55 x 10 <sup>5</sup>		C	4,33 x 10 <sup>4</sup>	
T6 (DP + inoculante)	A	8,63 x 10 <sup>3</sup>	9,19 x 10 <sup>4</sup>	A	5,66 x 10 <sup>2</sup>	6,66 x 10 <sup>2</sup>	A	Ausência de bradimirizóbio na diluição 10 <sup>-1</sup>	
	B	1,06 x 10 <sup>4</sup>		B	8,33 x 10 <sup>2</sup>		B	Presença de apenas 1 a 2 bradimirizóbios em algumas placas na diluição 10 <sup>-1</sup>	
	C	8,33 x 10 <sup>3</sup>		C	6,00 x 10 <sup>2</sup>		C		
T7 (DP + Pw + inoculante)	A	1,01 x 10 <sup>4</sup>	1,05 x 10 <sup>4</sup>	A	1,13 x 10 <sup>3</sup>	1,15 x 10 <sup>3</sup>	A		
	B	1,05 x 10 <sup>4</sup>		B	9,00 x 10 <sup>2</sup>		B		
	C	1,09 x 10 <sup>4</sup>		C	1,43 x 10 <sup>3</sup>		C		
T8 (MXL + inoculante)	A	1,55 x 10 <sup>5</sup>	1,36 x 10 <sup>5</sup>	A	4,27 x 10 <sup>4</sup>	3,90 x 10 <sup>4</sup>	A	6,16 x 10 <sup>3</sup>	5,96 x 10 <sup>3</sup>
	B	1,27 x 10 <sup>5</sup>		B	3,93 x 10 <sup>4</sup>		B	7,06 x 10 <sup>3</sup>	
	C	1,26 x 10 <sup>5</sup>		C	3,50 x 10 <sup>4</sup>		C	4,66 x 10 <sup>3</sup>	
T9 (MXL + Pw + inoculante)	A	4,40 x 10 <sup>5</sup>	4,78 x 10 <sup>5</sup>	A	3,04 x 10 <sup>5</sup>	2,97 x 10 <sup>5</sup>	A	1,80 x 10 <sup>5</sup>	1,50 x 10 <sup>5</sup>
	B	5,09 x 10 <sup>5</sup>		B	3,05 x 10 <sup>5</sup>		B	1,32 x 10 <sup>5</sup>	
	C	4,84 x 10 <sup>5</sup>		C	2,83 x 10 <sup>5</sup>		C	1,37 x 10 <sup>5</sup>	

**Tabela 6.** Avaliação comparativa do nº de UFC.sem.<sup>-1</sup> entre os tratamentos (análise estatística – Programa ASSISTAT).

Tratamentos	UFC.sem. <sup>-1</sup>
T1 Testemunha + inoculante	1,8 x 10 <sup>5</sup> bc <sup>(1)</sup>
T2 Protreat 2 + inoculante	9,0 x 10 <sup>4</sup> d
T3 Protreat 2 + Power + inoculante	2,1 x 10 <sup>5</sup> b
T4 Vitavax + Thiram + inoculante	4,5 x 10 <sup>4</sup> de
T5 Vitavax + Thiram + Power + inoculante	1,4 x 10 <sup>5</sup> c
T6 Derosal Plus + inoculante	3,3 x 10 <sup>3</sup> e
T7 Derosal Plus + Power + inoculante	3,9 x 10 <sup>3</sup> e
T8 Maxim XL + inoculante	6,0 x 10 <sup>4</sup> d
T9 Maxim XL + Power + inoculante	3,1 x 10 <sup>5</sup> a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

A comparação entre os períodos de tempo demonstrou que a sobrevivência das bactérias diminui ao longo do tempo (Tabela 7). Tedesco e Campos (2000) recomendam que sementes de soja inoculadas não devam ser armazenadas por mais de um dia, para que o patamar sugerido de células viáveis de bradirrizóbio por semente seja alcançado. Atualmente, a recomendação de bradirrizóbio nas sementes é de 1.200.000 células por semente, devido à alta taxa de mortalidade causada pelos fungicidas entre outras causas, com o intuito de garantir a sobrevivência das bactérias nas sementes, resultando na infecção e nodulação da soja (Campo *et al.*, 2008).

**Tabela 7.** Médias de UFC.sem.<sup>-1</sup> baseadas na diferença de tempo na inoculação (análise estatística – Programa ASSISTAT).

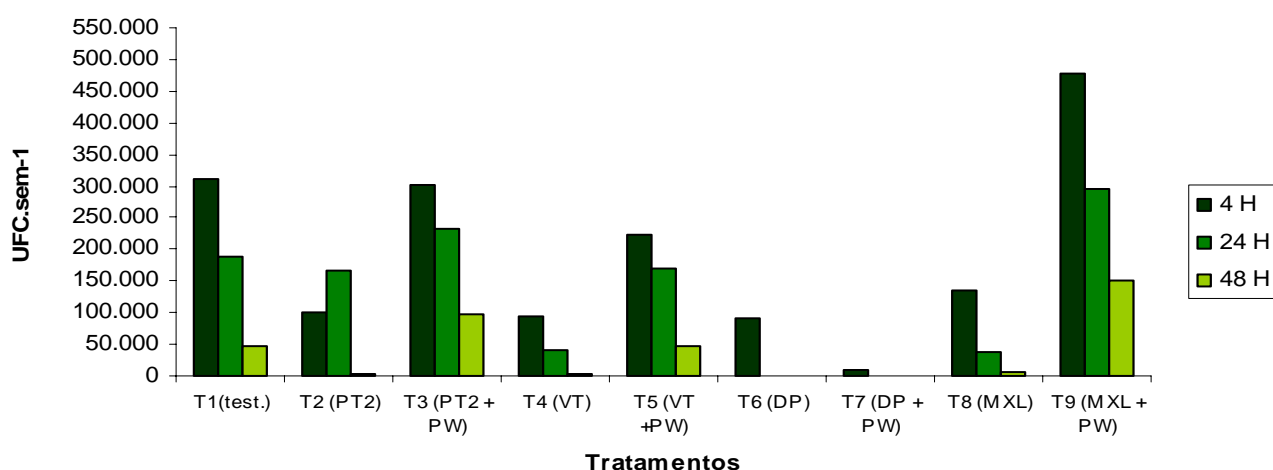
Tempo (horas)	UFC.sem. <sup>-1</sup>
4	1,8 x 10 <sup>5</sup> a <sup>(1)</sup>
24	1,3 x 10 <sup>5</sup> b
48	3,9 x 10 <sup>4</sup> c

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

O tratamento que recebeu o fungicida Maxim XL com aditivo celular Power (T<sub>9</sub>), mostrou os melhores resultados de recuperação dos bradimirizóbios nas sementes em todos os períodos de tempo, em comparação aos demais tratamentos, inclusive comparado ao tratamento Testemunha (T<sub>1</sub>), que não recebeu nenhum tipo de fungicida (Tabela 5). Por outro lado, o fungicida Derosal Plus foi o que apresentou o maior efeito deletério à sobrevivência do microrganismo na semente, não apresentando, inclusive, recuperação da bactéria nas sementes no período de 48 horas, tanto no tratamento sem aditivo celular “Power” (T<sub>6</sub>) quanto no tratamento com aditivo celular “Power” (T<sub>7</sub>). O fungicida Derosal Plus (Carbendazim + Thiram) é descrito como bastante tóxico em trabalhos anteriormente publicados (Pandolfo, 2007; Campo & Hungria, 2000) e pode diminuir em até 78% o número de nódulos radiculares na soja (Hungria *et al.*, 2001).

Os tratamentos que receberam os fungicidas PT2, VT e MXL e o aditivo Power (T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub> e T<sub>9</sub>) apresentaram maior longevidade do bradimirizóbio nas sementes em comparação aos respectivos tratamentos sem aditivo Power (T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> e T<sub>8</sub>) nos três períodos de tempo analisados (Tabela 8).

A Figura 7 apresenta o gráfico com os resultados obtidos da recuperação da bactéria nas sementes neste estudo.



## 4.2 ANÁLISE DA NODULAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Pelo Método de Burton Modificado, 100% das plantas, em todos os tratamentos que receberam inoculante ( $T_1$  a  $T_9$ ), tiveram nodulação satisfatória, ou seja, um mínimo de 3 nódulos bem desenvolvidos dentro da área do cilindro imaginário na coroa da raiz. O tratamento Testemunha Negativa ( $T_{10}$ ) não apresentou nodulação, validando o ensaio pela metodologia de Burton. A utilização desta metodologia foi estabelecida pela empresa contratante do projeto. Porém, o Método de Burton é utilizado pelo *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* (SENASA - Órgão Federal Argentino) para registro e fiscalização de produtos inoculantes naquele país, e não prevê testes em casa de vegetação realizados com inoculante e outros produtos (agrotóxicos, aditivos, etc.), como os utilizados neste ensaio.

### 4.2.1 Número de nódulos

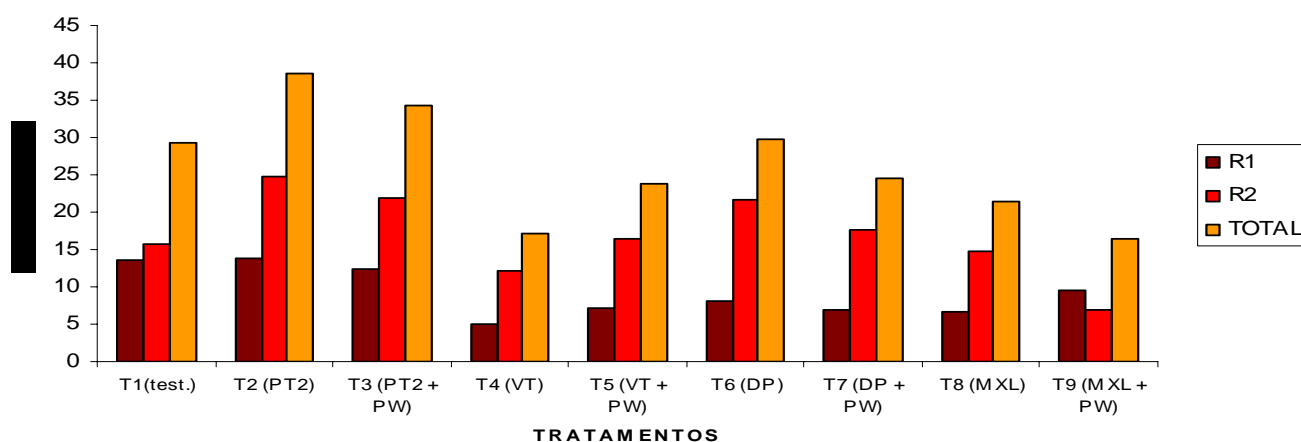
Os resultados obtidos mostram que as plantas oriundas de sementes apenas inoculadas ( $T_1$ ) e aquelas que receberam tratamento com o fungicida Protreat 2 (sem aditivo celular Power -  $T_2$ , e com aditivo -  $T_3$ ) não diferiram estatisticamente entre si quanto ao número de nódulos na raiz primária. Entretanto, estes tratamentos mostraram um efeito positivo no número de nódulos, com diferença estatística para os demais tratamentos. Não houve diferença significativa para o número de nódulos na raiz primária entre os tratamentos  $T_4$ ,  $T_5$ ,  $T_6$ ,  $T_7$ ,  $T_8$  e  $T_9$ .

Ao analisar os resultados do número de nódulos das raízes secundárias, temos que os tratamentos com fungicida Protreat 2 (com e sem aditivo celular Power -  $T_3$  e  $T_2$ , respectivamente) foram estatisticamente superiores aos do tratamento Testemunha ( $T_1$ ), assim como o tratamento com o fungicida Derosal Plus sem aditivo celular Power ( $T_6$ ). O tratamento com o fungicida Maxim XL sem aditivo celular Power ( $T_8$ ) foi estatisticamente superior ao respectivo tratamento com aditivo celular Power ( $T_9$ ), não diferindo do tratamento Testemunha ( $T_1$ ). O tratamento com o fungicida Maxim XL com aditivo celular

Power (T<sub>9</sub>) foi o que apresentou o menor número de nódulos nas raízes secundárias.

Quanto ao número de nódulos totais, o tratamento com fungicida Protreat 2 sem aditivo celular Power (T<sub>2</sub>) foi o que mostrou o melhor resultado entre os tratamentos, embora seja semelhante estatisticamente ao tratamento com Protreat 2 com aditivo celular Power (T<sub>3</sub>). Apenas o tratamento com o fungicida Vitavax-Thiram com aditivo celular Power (T<sub>5</sub>) foi estatisticamente superior ao respectivo tratamento sem o aditivo celular Power (T<sub>4</sub>), sem apresentar diferença quando comparado ao tratamento Testemunha (T<sub>1</sub>).

A representação gráfica da média do número de nódulos na raiz primária, nas raízes secundárias e na soma total de nódulos pode ser visualizada na Figura 8, conforme os resultados relatados acima.



#### 4.2.2 Peso seco de nódulos

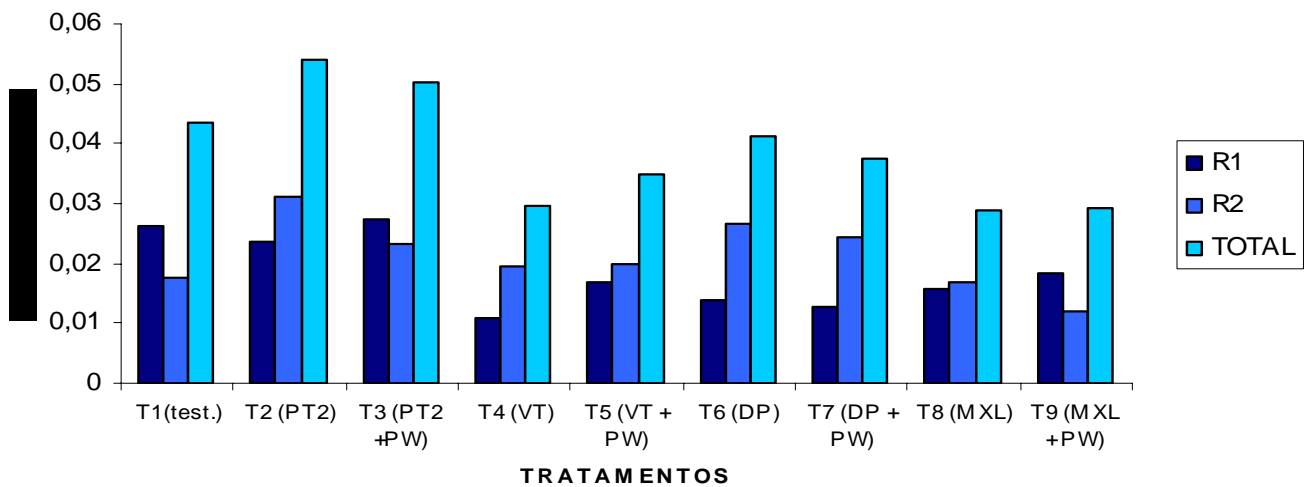
Na análise dos resultados do peso seco de nódulos na raiz primária, não foi obtida diferença significativa quanto à adição do produto Power nos tratamentos com sementes tratadas com fungicidas. Os tratamentos com o fungicida Protreat 2 com e sem aditivo celular Power ( $T_3$  e  $T_2$ , respectivamente) não diferiram estatisticamente do tratamento Testemunha ( $T_1$ ), e apresentaram a maior média de peso seco de nódulos entre todos os tratamentos analisados.

Nas raízes secundárias, o resultado do peso seco de nódulos dos tratamentos com fungicidas mostrou diferença significativa negativa para a utilização do aditivo celular Power nos tratamentos que utilizaram o fungicida Protreat 2 ( $T_2$  e  $T_3$ ). Os demais tratamentos não mostraram diferença estatística para a utilização do aditivo celular Power.

A interpretação dos resultados obtidos das médias de peso seco total de nódulos repetiu a situação encontrada desta análise na raiz primária, onde não houve diferença significativa da adição do produto Power aos tratamentos que receberam fungicidas. O tratamento com o fungicida Protreat 2 sem aditivo celular Power ( $T_2$ ), teve a maior média, diferindo estatisticamente, inclusive, do tratamento Testemunha ( $T_1$ ).

Os resultados obtidos na avaliação das médias de peso de nódulos na raiz primária, nas raízes secundárias e no peso total de nódulos podem ser observados graficamente na Figura 9.





A análise dos dados obtidos em casa de vegetação, tanto em relação à média do número de nódulos nas raízes, quanto em relação à média de seu peso, mostra pouco ou nenhum efeito da aplicação do aditivo celular Power nos tratamentos que receberam fungicidas. Tais resultados são contraditórios aos obtidos na análise de sobrevivência feita em laboratório, os quais mostraram uma melhora na taxa de sobrevivência do microrganismo nos tratamentos que receberam o aditivo celular Power, exceto para os tratamentos com o fungicida Derosal Plus. Por outro lado, os ensaios de casa de vegetação não demonstraram o fungicida Derosal Plus como o produto com o maior efeito nocivo à nodulação. Isso talvez, porque estudos *in vitro* expõem ao máximo o organismo à ação de produtos químicos, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja seletivo em campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* (como no caso do experimento, o fungicida Derosal Plus) nem sempre indica a sua elevada toxicidade no campo, mas sim a possibilidade de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves, 1999).

A diferença entre os resultados dos testes de sobrevivência e nodulação pode estar no fato de que, em laboratório, testou-se apenas a sobrevivência do

bradirrizóbio sob diferentes tratamentos, e sua capacidade de manifestar o crescimento através de UFC em meio de cultura, e em condições controladas.

Já no experimento em casa de vegetação, o objetivo foi analisar a capacidade de nodulação do microrganismo. Esse é um processo complexo e não depende apenas do fato do organismo estar vivo. O processo de nodulação e a posterior fixação biológica do nitrogênio dependem de sinais moleculares emitidos tanto pela planta, quanto pelo bradirrizóbio em um momento específico. Se por algum motivo, como estresse hídrico, deficiências nutricionais, alterações de pH, temperatura e umidade, por exemplo, tais sinais não são emitidos, essa nodulação não ocorre, apesar do microrganismo continuar vivo no solo (Moreira & Siqueira, 2002). A presença dos fungicidas na rizosfera da soja altera os exudatos das raízes (Martenson, 1992) e, como consequência, a emissão dos sinais moleculares e os estágios iniciais da infecção radicular, diminuindo a nodulação (Campo & Hungria, 2000).

Também deve-se levar em consideração que nunca se obtém a recuperação total das bactérias na semente e que esta característica pode ser responsável por essa diferença de resultados entre os dados de sobrevivência e os dados de nodulação no período de 24 horas (Bangel, com. pessoal).

Apesar da discrepância entre os resultados obtidos nos testes feitos em laboratório e em casa de vegetação, a análise feita pelo Método de Burton Modificado não revelou diferença entre nenhum dos tratamentos, não revelando benefício do aditivo celular "Power", nem prejuízo dos fungicidas à nodulação. Esses dados corroboram com os obtidos por Bueno e colaboradores em 2003, que testaram o efeito de fungicidas na sobrevivência e nodulação de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) em soja. Tais autores concluíram que o uso de fungicidas não influencia na redução da nodulação, embora reduzam a recuperação das bactérias na semente.

Sabe-se que várias empresas fabricantes de inoculantes vêm desenvolvendo trabalhos testando formulações aditivas para utilização conjunta com inoculantes, fungicidas e/ou micronutrientes, mas não possuem estes trabalhos publicados. Desse modo, há ausência de literatura científica sobre o assunto, o que não permite estudos de comparação entre o comportamento das formulações no sentido de proteção do microrganismo e efeitos na nodulação de soja. Os resultados encontrados neste trabalho, avaliando a

compatibilidade da utilização de fungicidas com inoculante adicionado do aditivo celular “Power”, não foram suficientes para fundamentar a recomendação desta prática de tratamento de sementes baseados no ensaio de casa de vegetação, embora evidenciem resultados favoráveis de recuperação das bactérias na semente. Assim, mais testes e estudos são necessários para um maior esclarecimento acerca da eficácia do produto.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos verificar que:

- O aditivo celular Power auxiliou na sobrevivência dos bradirrizóbios nas sementes em relação aos tratamentos que só receberam fungicidas nos três períodos de tempo analisados;
- O fungicida Derosal Plus demonstrou o maior efeito deletério à sobrevivência do bradirrizóbio no ensaio de recuperação das bactérias na semente, sem mostrar efeito benéfico do aditivo celular Power;
- A prática de inoculação com sementes tratadas com o fungicida Maxim XL adicionado do aditivo celular Power mostrou ser o tratamento mais compatível em relação à recuperação das bactérias na semente;
- No ensaio feito em casa de vegetação, a utilização do aditivo celular Power não demonstrou um efeito positivo na nodulação em nenhum dos tratamentos;
- Todas as práticas de inoculação com sementes de soja tratadas com os diferentes fungicidas adicionados, ou não, do aditivo celular Power não mostraram inconformidade de taxas segundo o Método de Burton Modificado (taxas acima de 80% de unidades positivas);
- Os resultados obtidos nos ensaios de nodulação não validam a compatibilidade de uso e indicação das práticas utilizadas nos diferentes tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORGES, A. C.; GUIMARÃES, W. V.; MUCHOVEJ, R. M. C.; DE LOS REYES GONZÁLES, G. **Resistance of *Bradyrhizobium japonicum* Strains to Different Fungicides and Herbicides.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 6, n. 4, p. 428-430, 1990.
2. BUENO, C. J.; MEYER, M. C.; SOUZA, N. L. **Efeito de Fungicidas na Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na Nodulação de Soja.** Acta Scientiarum: Agronomy, Maringá, v. 25, n. 1, p. 231-235, 2003.
3. BURTON, J. C. **Monitoring Quality in Legume Inoculants and Preinoculated Seed.** The Nitragin Co., Milwaukee, p. 308-325, 1978.
4. CAMPO, R. J.; ARAÚJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. **Efeito da População de Células na Nodulação e Rendimento da Soja.** In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 30. Rio Verde, 2008. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2008. 1 ed., p. 302-304.
5. CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de Uso de Inoculantes e Fungicidas no Tratamento de Sementes de Soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 26).
6. CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Efeito do Tratamento de Sementes de Soja com Fungicidas na Nodulação e Fixação Simbiótica do N<sub>2</sub>.** Londrina: Embrapa Soja, 1999. 7 p. (Embrapa Soja. Pesquisa em Andamento).
7. CRISPINO, C. C.; FRANCHINI, J. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLE, R. N. R.; LOUREIRO, M. F.; SANTOS, E. N.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Adução Nitrogenada na Cultura de Soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2001. 6p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 75).
8. DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. **Inoculação de sementes de leguminosas.** Seropédica: Embrapa UAPNPBS, 1985. 31 p. (Embrapa UAPNPBS. Circular Técnica, 1).
9. DUNIGAN, E. P.; FREY, J. P.; ALLEN, L. D.; McMAHON, A. **Herbicidal effects on the Nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill.** Agronomy Journal, v. 64, p. 806-808, 1972.
10. EMBRAPA SOJA. **A Pesquisa.** Disponível em:  
< <http://www.cnpso.embrapa.br/html/nitrog.htm>>. Acesso em: 12 outubro 2008.

11. EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil – 2001/2002**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 267 p. (Embrapa Soja. Documentos, 167).
12. FAO. **Inoculantes para leguminosas y su uso**. In: FAO, ed. Rome: FAO, 1985. p. 5.
13. GAUR, A. C. **Effect of pesticides on Symbiotic Nitrogen Fixation by Legumes**. Indian Journal of Microbiology, Delhi, v. 20, p. 362-370, 1980.
14. GUENE, N. F. D.; DIOUF, A.; GUEYE, M. **Nodulation and Nitrogen Fixation of Field Grow Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) as Influenced by Fungicide Seed Treatment**. African Journal of Biotechnology, South Africa, v. 2, n. 7, p. 198-201, jul/2003.
15. HENNING, A. A.; CAMPO, R. J.; SFREDO, G. J. **Tratamento com Fungicidas, Aplicação de Micronutrientes e Inoculação de Sementes de Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1997. 7p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 58).
16. HENNING, A. A. Testes de Sanidade de Sementes de Soja. In: SOAVE, J. C.; WETZEL, M. M. V. S. (Eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p. 441-454.
17. HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura da Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35), (Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).
18. HUNGRIA, M; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The Importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South América. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. 1. ed. v. 4. Netherlands: SPRINGER NETHERLANDS, 2005. p. 25-42.
19. KYEI-BOAHEN, S.; SLINKARD, A. E.; WALLEY, F. L. **Rhizobial Survival and Nodulation of Chickpea as Influenced by Fungicide Seed Treatment**. Canadian Journal of Microbiology, Toronto, v. 47, p. 585-589, jun/2001.
20. MARTENSSON, A. M. **Effects of Agrochemicals and Heavy Metals on Fast-Growing Rhizobia and Their Symbiosis With Small-Seeded Legumes**. Soil Biology and Biochemistry, v. 24, n. 5, p. 435-445, 1992.
21. MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; STAUT, L.A. Eficiência da Fixação Biológica do Nitrogênio pela Inoculação de Estirpes de *Bradyrhizobium* em Soja, no Estado de Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE

- INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE), 13. Londrina, 2007. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 1. ed., p. 29.
22. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **SISLEGIS – Sistema de Legislação Agrícola Federal:** Instrução Normativa nº 5, DE 06 DE AGOSTO DE 2004. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8590>>
23. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **SISLEGIS – Sistema de Legislação Agrícola Federal:** Portaria nº 31, DE 08 DE JUNHO DE 1982. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7096>>
24. MOINO Jr, A.; ALVES, S. B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no Comportamento de Limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen.). **Anais da Sociedade de Entomologia**, Piracicaba, v. 27, p. 611-620, 1998.
25. MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2002.
26. OLIVEIRA, P. P. A., TSAI, S. M.; CORSI, M.; DÍAZ, M. D. P. **Interação Entre Cultivares, Estirpes Comerciais de *Rhizobium Meliloti* e Fungicidas no Incremento da Produção de Alfafa**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 34, n. 3, p. 425-431, mar/1999.
27. PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e Fungicidas no Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
28. TEDESCO, V.; CAMPOS, B. C. **Sobrevivência de Células de *Bradyrhizobium* na Superfície de Sementes de Soja**. Revista Científica Unicruz, v. 3, p. 9-15, 2000.