

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

**VIABILIDADE DA INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM PRODUTOS
COMERCIAIS A BASE DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ANTES DA
SEMEADURA**

Área: Microbiologia Agrícola

Aluna: Adriane Deitos dos Santos
Supervisor: Claudio Gilnei Lilge
Orientadora: Profa. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado como
requisito parcial para a conclusão do
Curso Superior de Tecnologia em
Biotecnologia

PALOTINA - PR
Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

VIABILIDADE DA INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM PRODUTOS
COMERCIAIS A BASE DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ANTES DA
SEMEADURA

Aluna: Adriane Deitos dos Santos
Supervisor: Claudio Gilnei Lilge
Orientadora: Profa. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado como
requisito parcial para a conclusão do
Curso Superior de Tecnologia em
Biotecnologia

PALOTINA - PR
Agosto de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
Área de Estágio: Microbiologia Agrícola
Acadêmico: Adriane Deitos dos Santos
Supervisor do Estágio: Cláudio Gilnei Lilge
Orientadora do Estágio: Profa. Dra. Roberta Paulert

O presente TCC foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Vivian Carré Missio

Prof. Dr. Leandro Paiola Albrecht

Profa. Dra. Roberta Paulert
Orientadora

Palotina, 07 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo Dom da sabedoria e da determinação por seguir até o final.

Agradeço a minha família, que apesar da distância, contribuíram para minha formação.

Ao meu namorado David, que entendeu minha ausência, me fortalecendo com palavras sinceras para a conclusão desta etapa de minha vida.

A minha orientadora Roberta Paulert, a qual não mediu esforços para correção e orientação deste trabalho, com certeza muito mais que obrigado.

Ao Supervisor do Campo Experimental Enoir Cristiano Pellizzaro por ter cedido a área para o experimento de campo além do apoio na condução dos experimentos.

As minhas amigas Jéssica e Tânia, pessoas que desde o início estiveram presentes e foram as melhores companhias da minha vida acadêmica.

Agradeço ao pessoal no campo experimental: Agenor, Marciano, Douglas, Leandro e José, sem vocês com certeza não teria conseguido conduzir os experimentos de Campo.

Ao pessoal do laboratório de sementes: Ivan, Cláudio, Beatriz, Angela, Natalia, Suelen, Jéssica e Tânia, pela paciência em ensinar as técnicas e pela orientação na condução deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a este trabalho.

SUMÁRIO

1	Introdução	8
2	Revisão Bibliográfica	10
2.1	Fixação biológica de nitrogênio	10
2.2	Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja	12
2.3	Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	12
2.4	Formação dos Nódulos	14
3	Objetivo Geral	16
3.1	Objetivos Específicos	16
4	Material e Métodos	17
4.1	Descrição do local de Estágio	17
4.2	Descrição das atividades do estágio	17
4.3	Tratamento das sementes de soja com produtos comerciais	18
4.4	Unidade experimental	20
4.5	Caracterização edafoclimática do local	21
4.6	Teste de germinação de sementes de soja tratadas	22
5	Resultados e Discussões	23
5.1	Avaliação dos nódulos das plantas cultivadas na primeira época	23
5.2	Avaliação da germinação das sementes de soja tratadas no experimento da primeira época	25
5.3	Avaliação dos nódulos das plantas cultivadas na segunda época	26
5.4	Avaliação da germinação das sementes de soja tratadas no experimento da segunda época	27
6	Análise Crítica do estágio	29
7	Conclusões	30
8	Referências Bibliográficas	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Nódulos desenvolvidos em soja comercial, inoculados com produtos a base de bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	16
Figura 2 Estágios de infecção e formação de nódulos em raízes de soja....	18
Figura 3 A) Bloco onde os ensaios foram conduzidos na solo. B) Bloco onde foram conduzidos na areia	23
Figura 4 Nódulos isolados de raízes de soja.....	24

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Reação dos produtos (inoculantes, fungicidas e Inseticidas) utilizados para realização dos ensaios com sementes de soja.....	18
Tabela2	Massa de nódulos secos das plantas de soja, semeadas após tratamento e inoculação e 30 dias após o plantio.....	23
Tabela 3	Teste de germinação em laboratório realizado no mesmo dia de tratamento das sementes e inoculação com a <i>Bradyrhizobium Japonicum</i>	26
Tabela 4	Massa seca dos nódulos, comparando os dois ambientes de armazenamento das sementes semeadas.....	27
Tabela 5	Teste de germinação das sementes armazenadas no Hermético	28
Tabela 6	Teste de germinação das sementes armazenadas no Hermético	28

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) na soja ocorre através da simbiose de raízes com bactérias (rizóbios). Quando utilizada à inoculação antecipada com produtos formulados com a bactéria *Bradyrhizobium*, o objetivo é obtenção de melhor rendimento para plantas, mesmo que as sementes inoculadas fiquem sob determinado período armazenadas em Hermético (temperatura controlada) ou em galpão (temperatura ambiente). O presente trabalho teve como objetivo inocular sementes de soja para analisar a viabilidade da inoculação antecipada, como também o potencial de crescimento da plantas. Foram realizados estudo a campo, onde as sementes previamente tratadas com três produtos comerciais a base de *Bradyrhizobium japonicum*, foram semeadas no solo ou em areia, em duas épocas, sendo que a primeira foi logo após tratamento/inoculação e a segunda 30 dias após. Foram utilizados quatro diferentes tratamentos para avaliação: sementes testemunhas sem inoculação, tratadas apenas com fungicida, sementes tratadas com fungicida + inoculante e tratadas apenas com inoculantes. Realizou-se também avaliação em laboratório através do teste de germinação quinzenal após os tratamentos. Ao término das avaliações, observou-se que as plantas cultivadas em areia não desenvolveram nódulos. Por outro lado, foi possível observar que nas plantas cultivadas em solo, todos os tratamentos das sementes favoreceram a produção de nódulos nas raízes, quando comparados com as plantas controle. No entanto, quando as sementes foram tratadas e armazenadas antes do plantio, a massa seca de nódulos obtida foi inferior (menos que a metade) à massa necessária para fixar nitrogênio. Foi possível observar também que a germinação das sementes não foi influenciada pelos tratamentos e nem pelo armazenamento.

Palavra Chave: *Bradyrhizobium*, inoculante, fixação biológica de nitrogênio.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (em torno de 70%). Nas plantas é o componente responsável por várias reações além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção, a translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado (RYLE et al., 1979; TAIZ e ZIEGER, 2004). Segundo Gerahty et al. (1992) este nutriente pode ser absorvido do solo na forma de NH_4^+ ou de NO_3^- ou através do N_2 atmosférico pela fixação biológica. Nas leguminosas o nitrogênio é absorvido na forma de N_2 e transformado em NH_4 através do processo simbiótico com bactérias.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo realizado por microrganismos denominados diazotróficos, que convertem o nitrogênio atmosférico em uma forma disponível (amônia) para as plantas e outros microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; HUNGRIA e CAMPOS, 2005). Um caso típico desta associação é a simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Photorhizobium*, *Sinorhizobium* (TAIZ e ZIEGER, 2004).

No Brasil, a semeadura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem sido recomendada sem uso de fertilizantes nitrogenados. A adaptabilidade da cultura às mais diversas condições edafoclimáticas brasileiras deve-se, em grande parte, à FBN, que substitui a adubação nitrogenada mineral, propiciando redução significativa do custo de produção (HUNGRIA et al., 2007).

O uso de inoculante com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* é, atualmente, uma tecnologia indispensável para a cultura da soja. A eficiência desses microrganismos tem possibilitado a obtenção de altos rendimentos de grãos da cultura, sem a necessidade de aplicação de nitrogênio mineral (ALVES et al., 2003). A utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* possibilita uma economia anual aproximada de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados (FAGAN et al., 2007). De acordo com SMITH e HUME (1987), a associação do *Bradyrhizobium japonicum* com a soja pode resultar numa fixação de nitrogênio de até 102,9 kg de $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Alguns fatores como a estirpe utilizada, adesivos, dose do inoculante, tratamento de sementes com fungicidas, adubação da cultura e condições ambientais podem interferir no estabelecimento da simbiose planta-rizóbio (CAMPO e HUNGRIA, 2000). Nesse sentido, a aplicação de fungicidas via tratamento de sementes pode reduzir significativamente a população de *Bradyrhizobium* nas mesmas (ANNAPURNA, 2005) e reduzir o número e a matéria seca de nódulos (ANDRÉS et al., 1998; BIKROL et al., 2005).

De acordo com Campo e Hungria (2007), as avaliações realizadas em diversos experimentos no Brasil, durante três anos consecutivos, indicaram ser possível de realizar a inoculação antecipada das sementes da soja em até cinco dias antes da semeadura, o que possibilitaria ao produtor realizar a inoculação previamente à semeadura e executá-la no momento oportuno.

Novas formas de inoculação, como o uso de inoculantes líquidos aplicados ao sulco de semeadura da cultura, com uso de semeadoras próprias ou adaptadas, e a inoculação das sementes com maior antecedência da semeadura têm se constituído estratégias que tendem a difundir-se em lavouras de soja.

Contudo, mesmo possuindo grande potencial agrícola, são poucas as informações que destacam os benefícios da bactéria *Bradyrhizobium* para o rendimento da cultura da soja, principalmente para solos desprovidos de bactérias nodulantes, arenosos e com baixo teor de matéria orgânica. Desta forma, este estudo buscou avaliar o potencial da inoculação de produtos comerciais a base de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja antes da semeadura em estudo de campo com solo e com areia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o seu uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO e ROSSI, 2000).

O cenário atual mostra que a cultura da soja tem apresentado elevado aumento na área plantada, o que necessita de maiores investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de cultivares mais resistentes, que por consequência melhora o rendimento. Além destes fatores, estima-se que apenas uma pequena porcentagem de leguminosas tenha sido investigada quanto à capacidade de FBN, evidenciando a necessidade de explorar melhor o grande potencial genético no país (HUNGRIA e CAMPOS, 2005).

2.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

Dentre os organismos fixadores de nitrogênio, destacam-se as bactérias chamadas genericamente de rizóbios que se associam com plantas leguminosas. Segundo Graham e Vance (2003), a simbiose entre leguminosas e rizóbios é a fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas. Esta associação destaca-se das demais devido à sua importância econômica e pela maior eficiência do processo de fixação, decorrente de uma parceria mais evoluída entre macro e microsimbiontes chamada de simbiose (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Uma associação rizóbio-leguminosa eficiente, na qual a necessidade da planta por nitrogênio seja totalmente suprida pela FBN, é o alvo de muitas pesquisas desenvolvidas no mundo, principalmente nos trópicos (FERNANDES et al., 2003; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Por outro lado, a fixação eficiente depende de diversos fatores como temperatura, umidade, características químicas e físicas do solo, os quais influenciam tanto a planta quanto a bactéria. Outro fator de reconhecida interferência no processo é a compatibilidade entre a planta hospedeira e o rizóbio (HERRIDGE e ROSE, 2000), que independente das condições do ambiente e permitirá ou não que o processo se estabeleça de maneira que ambos os organismos sejam favorecidos.

O uso de inoculantes contendo rizóbios, em diversas leguminosas substituindo total ou parcialmente os adubos nitrogenados, propicia uma economia significativa nos custos de produção (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A redução do N₂ atmosférico à amônia é realizada por um complexo enzimático denominado nitrogenase, que possui a capacidade de clivar a tripla ligação do N₂. Este complexo é composto por duas proteínas diferentes, a dinitrogenase (Mo-Fe proteína) e dinitrogenase-redutase (Fe-proteína) (DROZDOWICZ, 1997). A nitrogenase é bastante sensível ao oxigênio, pois ele provoca desnaturação irreversível de ambos os componentes protéicos. Desta forma, os microrganismos fixadores de N₂ apresentam mecanismos capazes de proteger a nitrogenase da ação do oxigênio (DROZDOWICZ, 1997). Assim, a FBN em algumas bactérias ocorre dentro de nódulos de plantas hospedeiras leguminosas, em simbiose com essas bactérias.

Os microrganismos que realizam a FBN são conhecidos como fixadores simbióticos, como exemplo, estão às bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros (DROZDOWICZ, 1997; ARAÚJO e CARVALHO, 2006).

A FBN é uma opção alternativa e natural de adubação nitrogenada, pois o uso indiscriminado de adubos nitrogenados tem ocasionado vários problemas de contaminação, pois uma parte alcança depósitos e cursos d'água (ROMERO et al., 1998). Segundo Franco et al. (2002), a FBN é uma das formas de aumentar a produtividade de leguminosas e substituir os adubos nitrogenados minerais.

A necessidade de adubação nitrogenada, a perda de nitrogênio para o ambiente, o alto custo de produção baseado em consumo de energia fóssil e os riscos de aplicação de nitrogênio são fatores que justificam a condução de pesquisas no sentido de utilizar bactérias capazes de fixar nitrogênio diretamente da atmosfera, reduzindo assim perdas para o ambiente, a poluição de águas, solos e o custo de produção (LADHA & REDDY, 2003).

No entanto, segundo Franco e Neves (1992) o processo da FBN pode ocorrer com eficiência em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio no solo, embora seja recomendado o uso de pequenas doses de nitrogênio aplicadas no plantio (HUNGRIA et al., 1994) para melhorar o crescimento das plantas e promover efeito sinérgico sobre a nodulação (TSAI et al., 1993).

2.2 Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja

Fixação biológica do nitrogênio é a principal fonte de nitrogênio para a cultura da soja. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, quando em contato com as raízes da soja, infectam as raízes via pêlos radiculares, formando os nódulos. A FBN pode, dependendo de sua eficiência, fornecer todo o nitrogênio que a soja necessita (EMPRAPA, 2004). O nitrogênio, por ser um dos constituintes dos ácidos nucleicos, proteínas, entre outras moléculas que são fundamentais para os processos biológicos, com exceção da água, é geralmente considerado o nutriente limitante ao crescimento de plantas; assim, é requerido em maior quantidade pelas mesmas (HUNGRIA et al., 2007).

O teor elevado de proteína dos grãos de soja resulta em uma demanda de 80 kg de nitrogênio para cada 1.000 kg de grãos produzidos. A soja, porém, pode suprir todas as necessidades em nitrogênio pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico, em que bactérias *Bradyrhizobium japonicum* se associam às raízes da planta formando estruturas específicas, os nódulos, conseguindo, então, capturar o nitrogênio e transformá-lo em formas nitrogenadas utilizáveis pela planta.

A FBN para cultura da soja ocorre entre cinco e oito dias após a emergência, ou seja, começa o seu crescimento vegetativo produzindo um trifólio após o outro, e conseqüentemente o aparecimento dos primeiros nódulos. Após este período inicial, a nodulação e fixação do nitrogênio se intensificam até o florescimento ou o período de formação das vagens.

2.3 Gênero *Bradyrhizobium*

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

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* apresentam crescimento lento, tempo de geração de 7 a 13 horas e alcalinização do meio de cultivo levedura-manitol, contendo azul de bromotimol como indicador de pH. São Gram-negativos e possuem a forma de bastonete, sendo a sua mobilidade dada por um flagelo polar ou subpolar. A temperatura ótima para o seu crescimento ocorre entre 25 e 30°C e em meio de cultivo levedura-manitol apresentam colônias brancas, circulares, convexas e opacas, raramente translúcidas, tendendo a ser granulares na textura e seu tamanho não excede a um milímetro de diâmetro para um período de incubação de cinco a sete dias. As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas tropicais e temperadas (HOLT et al., 1994; SOMASEGARAN e HOBEN, 1994).

Na década de 80 e início da década de 90, vários trabalhos começaram a demonstrar que existia grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* (HOLLIS et al., 1981; STANLEY et al.). Os resultados obtidos levaram Kuykendall et al. (1992), a sugerirem a subdivisão de *B. japonicum* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I (I e Ia) e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II, sendo esta nova nomenclatura aceita e validada pelo International Journal of Systematic Bacteriology a partir de 1993.

A inoculação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em sementes de soja proporcionou uma considerável redução no custo de produção dessa cultura pela eliminação da necessidade de adubação nitrogenada, 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 (EMBRAPA, 2001).

O genoma dos rizóbios apresenta um cromossomo e pode conter um número variável de plasmídeos. Os genes estruturais da nitrogenase redutase *nifH* e os genes determinantes de várias etapas da nodulação, *nod*, *noe* e *nol*, estão contidos em um único plasmídeo simbiótico (*pSym*) (HUGHES, 2000).

Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja no Brasil. Duas são pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (SEMIA, “Seção de Microbiologia Agrícola”) e a SEMIA 5019, recomendadas desde 1979, e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a CPAC 15 (=SEMIA 5079) e a CPAC 7

(=SEMIA 5080), que vêm sendo utilizadas intensamente em inoculantes comerciais desde 1992 (FAGAN et al., 2007).

2.4 Formação dos Nódulos

A formação do nódulo envolve uma série de trocas de moléculas sinalizadoras entre a planta e a bactéria. A planta hospedeira secreta substâncias como aminoácidos, CO₂, hormônios, ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, proteínas, flavonóides, entre outras (BROUGHTON et al., 2003).

A FBN envolve uma sucessão de processos que começam com a adaptação da bactéria à planta e culminam na fixação do nitrogênio atmosférico. A nodulação ocorre aproximadamente 2 horas após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI et al., 1980). Ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e o poder redutor necessários para o processo de FBN. As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1994).

Segundo Vargas e Hungria (2007), os nódulos (Figura 1) estão presentes em raízes de plantas leguminosas e são formados como resultado da infecção provocada pelas bactérias fixadoras simbióticas. Plantas leguminosas como a soja e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) são infectadas, principalmente, por diazotróficos dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente.



Figura 1. Nódulos desenvolvidos em soja comercial, inoculados com produtos a base de bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Fonte: Santos, 2013.

O processo de nodulação envolve múltiplas etapas e a expressão de genes específicos da planta hospedeira e da bactéria. O processo se inicia com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos (em geral, flavonóides) que, facilitam a colonização da rizosfera, e outros compostos que apresentam ação quimiotática, possibilitando que as bactérias cheguem até a raiz das plantas hospedeiras, às quais se aderem. Esses flavonóides desencadeiam na bactéria a produção de fatores de nodulação (fatores Nod). Os fatores Nod são lipooligossacarídeos quitinos específicos que interagem com a planta, apresentando como primeiro efeito a curvatura do pêlo radicular; em seguida promovem a divisão das células corticais e conduzem à formação do nódulo. Quando as bactérias penetram o pêlo da raiz são internalizadas em um compartimento circundado por uma membrana denominado de simbiossomo, onde passam a ser chamadas de bacteróides (VARGAS e HUNGRIA, 1997; HIRSCH et al., 2003; STACEY et al., 2006).

Flavonóides são compostos fenólicos sintetizados em várias partes da planta, e podem funcionar como moléculas sinais para a simbiose com microrganismos (GRAHAM, 1991; SUBRAMANIAN et al., 2007). Segundo Subramanian et al. (2007), as isoflavonas (classe de flavonóides) são as maiores indutores dos genes-*nod* em estipes de *B. japonicum*, o principal simbiote de soja. Além disso, a existência da nodulação é diretamente influenciada pela presença de flavonóides confirmando, assim, que esses compostos são indispensáveis para a nodulação. Todavia, existem outros compostos não-flavonóides, como betaínas e xantonas, que também induzem a expressão dos genes de nodulação (SUBRAMANIAN et al., 2007).

Para entender melhor como ocorre o crescimento e desenvolvimento do nódulo Gerahty et al. (1992) explicam, de forma cronológica, como acontece à alteração anatômica nas raízes de soja após a infecção, quando são iniciadas divisões celulares dentro e fora do córtex radicular gerando nódulos meristemáticos onde ocorrem sucessivas divisões mitóticas. O estágio 0 -corresponde à raiz não infectada, estágio I - início da infecção, estágio II - células corticais externas começam a se dividir, estágio III - a divisão é evidente no córtex interno e algumas células do córtex externo, estágio IV – as células são mais isodiamétricas e apresentam algumas divisões oblíquas externamente e internamente no córtex, formando um meristema nodular, estágio V- o meristema é aumentado e estágio VI - emergência do nódulo (Figura 2).

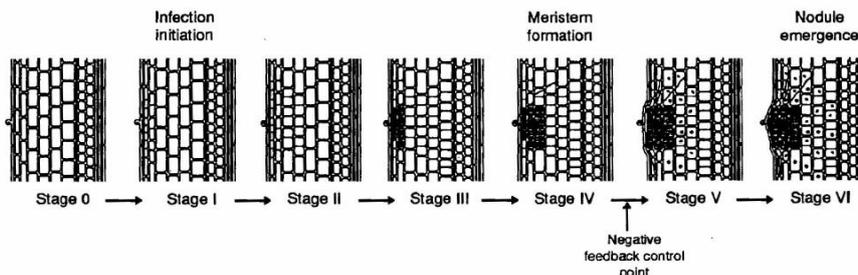


Figura 2. Estágios de infecção e formação de nódulos em raízes de soja. Fonte: Gerahty et al. (1992).

Fixação do nitrogênio no nódulo ocorre quando o nitrogênio é transformado em NH_3 a custas de energia da planta (BURRIS, 1999; TAÍZ e ZIEGER, 2004). O complexo enzima nitrogenase formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína) são responsáveis pela fixação de nitrogênio no nódulo (BURRIS, 1999; MYLONA et al., 1995; TAÍZ e ZIEGER, 2004).

Para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio é necessário que a nitrogenase se encontre em condições anaeróbicas. Os nódulos possuem uma heme proteína, chamada de leghemoglobina, que se liga ao oxigênio e que está presente em altas concentrações nos nódulos. A planta produz a porção globina em resposta à infecção da bactéria, tendo esta proteína uma alta afinidade por O_2 .

Tanto a leghemoglobina como a barreira de difusão de oxigênio no nódulo são reguladores importantes na tensão de oxigênio no nódulo protegendo o complexo enzima nitrogenase que é irreversivelmente inativado pelo oxigênio (MYLONA et al., 1995). De acordo com Deninson e Harter (1995) a leghemoglobina é um importante transportador de oxigênio para as células bacterianas, sendo capaz de armazenar O_2 suficiente para a manutenção da respiração celular por alguns segundos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de inoculantes no desenvolvimento inicial da soja.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o potencial da inoculação sementes de soja com três produtos comerciais contendo a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* antes da semeadura;
- Avaliar o potencial das sementes armazenadas em locais com diferentes temperaturas;
- Realizar estudo de campo no solo e areia;
- Determinar após coleta o peso seco dos nódulos;
- Avaliar através de testes de germinação o crescimento inicial da soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição do local de estágio

As atividades relacionadas ao estágio supervisionado foram realizadas na empresa C.Vale localizada no município de Palotina - Pr. O período das atividades relativas ao estágio foram de três meses (de maio à julho de 2013), totalizando 370 horas de estágio obrigatório.

A C.Vale é uma cooperativa agroindustrial com atuação no Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e também no Paraguai. Possui 106 unidades de negócios, mais de 13.700 mil associados e 5.600 funcionários. Destaca-se na produção de soja, milho, trigo, mandioca, leite, frango e suínos, e atua na prestação de serviços, com mais de 150 profissionais que dão assistência agrônômica e veterinária aos associados.

As avaliações das sementes e as técnicas empregadas foram desenvolvidas no Laboratório de Sementes da C.Vale e o plantio das parcelas de soja foram realizadas no Campo Experimental da mesma empresa.

4.2 Descrição das atividades do estágio

Durante o período de estágio, as seguintes atividades foram desenvolvidas:

a) **Teste de Tetrazólio para avaliar a viabilidade e o vigor dos lotes de sementes além de fornecer o diagnóstico** das causas pela redução da qualidade (danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejos). Este teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e

insolúvel, denominada de formazam, nos tecidos vivos da semente (DELOUCHE et al., 1976).

b) Análise de Pureza. Tem como finalidade avaliar a composição percentual por peso e a identidade das diferentes espécies de sementes e do material inerte da amostra e por inferência a do lote de sementes.

c) Teste de Envelhecimento. Utilizado para avaliar o vigor de sementes ou estimar o potencial de armazenamento de sementes, particularmente para sementes de milho e soja (HAMPTON & TEKRONY, 1995; MARCOS FILHO, 1999).

d) Peso de Mil Sementes. É utilizado para calcular a densidade de semeadura, o número de sementes por embalagem e o peso da amostra de trabalho para análise de pureza. É uma informação que dá idéia do tamanho das sementes, assim como de seu estado de maturidade e de sanidade.

e) Experimentos a campo com a cultura da soja: Foram realizados ensaios a campo para avaliar a inoculação da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em plantas de soja a partir de inoculantes comerciais, sendo considerado a parte principal deste relatório de estágio conforme segue abaixo.

4.3 Tratamento das sementes de soja com produtos comerciais

Foram utilizadas 20 kg de sementes de soja comercial para cada tratamento. Foram realizados três diferentes tratamentos com produtos comerciais e um controle (testemunha, sem tratamento), conforme descrito na **Tabela 1** abaixo.

Tabela 1. Reação dos produtos (inoculantes, fungicidas e Inseticidas) utilizados para realização dos ensaios com sementes de soja.

Tratamentos	Produto Comercial	Dosagem do produto comercial (mL/kg)
1 (Testemunha)	Testemunha (sem tratamento)	-
Manejo 2	fipronil + tiofanato metílico +	2

	piraclostrobina (Produto comercial 1)	
Manejo 3	fipronil + tiofanato metílico + piraclostrobina (Produto comercial 1)	2
	Água	2
	Inoculante Líquido (Produto comercial 2)	3
	Polímero	1,5
	Inoculante Turfoso (Produto comercial 3)	3
Manejo 4	Água	2
	Inoculante Líquido (Produto comercial 2)	3
	Polímero	1,5
	Inoculante Turfoso (Produto comercial 3)	3

No controle as sementes de soja não foram tratadas com nenhum produto comercial, servindo de testemunha para os demais experimentos.

O produto comercial, composto por fipronil + tiofanato metílico + piraclostrobina apresenta propriedades fungicida e inseticida, é utilizado no tratamento de sementes pois protege as plântulas contra o ataque de pragas, e fungos no período inicial de desenvolvimento da cultura.

Outro grupo de sementes (tratamento 3) recebeu o tratamento com fipronil + tiofanato metílico + piraclostrobina, juntamente com o Polímero (para aderência das sementes ao tratamento), e com o inoculante líquido e turfoso. Ambos os inoculantes são também produtos comerciais, formulados a base de bactérias *Bradyrhizobium japonicum*.

O inoculante turfoso, é um produto especial canadense esterilizado por radiação gama. Possui alto teor de matéria orgânica, proporciona alta concentração de rizóbios (5×10^9 rizóbios por grama), melhora os níveis de matéria orgânica do solo, fornece grande parte de nitrogênio que a soja necessita, potencializa a fixação

biológica de nitrogênio, aumentando o rendimento de grãos por planta e dispensa o uso de adubos nitrogenados, como uréia e nitratos.

O que diferencia os inoculantes líquido e o turfoso é sua formulação, ao invés de possuir composição de turfa, inoculante líquido, é um concentrado fluido. Por outro lado, o polímero tem como finalidade auxiliar na fixação dos produtos nas sementes e mesmo em condições adversas de clima (chuva por exemplo), o inoculante e o fungicida não se desprendem das sementes.

Por sua vez, as sementes pertencentes ao outro grupo (tratamento 4) foram tratadas com os inoculantes líquido e turfoso adicionando-se polímero. Não adicionou-se o produto fungicida/inceticida neste tratamento.

Após realizar os tratamentos, as sementes foram separadas, 10 kg de cada tratamento foi direcionado ao galpão localizado no Campo experimental da C.Vale, com temperatura ambiente não controlada e os outros 10 kg foram armazenados no Hermético da referida empresa com controlada temperatura entre 18° e 20° graus. O objetivo da duplicidade de armazenamento está na verificação das possíveis diferenças dos resultados posteriores. O galpão simula o local que a maioria dos produtores possui para armazenar as sementes.

4.4 Unidade experimental

O experimento a campo foi conduzido na estação Experimental da C.Vale, sendo realizado em duas épocas (cada uma em solo e em areia) e os blocos selecionados ao acaso.

A primeira época foi plantada no dia 18 de maio de 2013, tanto na solo como na areia (Figura 3), sendo os blocos constituídos de 16 parcelas. As parcelas foram divididas conforme os tratamentos, sendo que cada tratamento apresentou quatro linhas, onde foram semeadas 100 sementes em cada linha, totalizando 400 sementes por tratamento.

Os canteiros receberam água quando necessário para melhor desempenho e crescimento das mudas de soja.

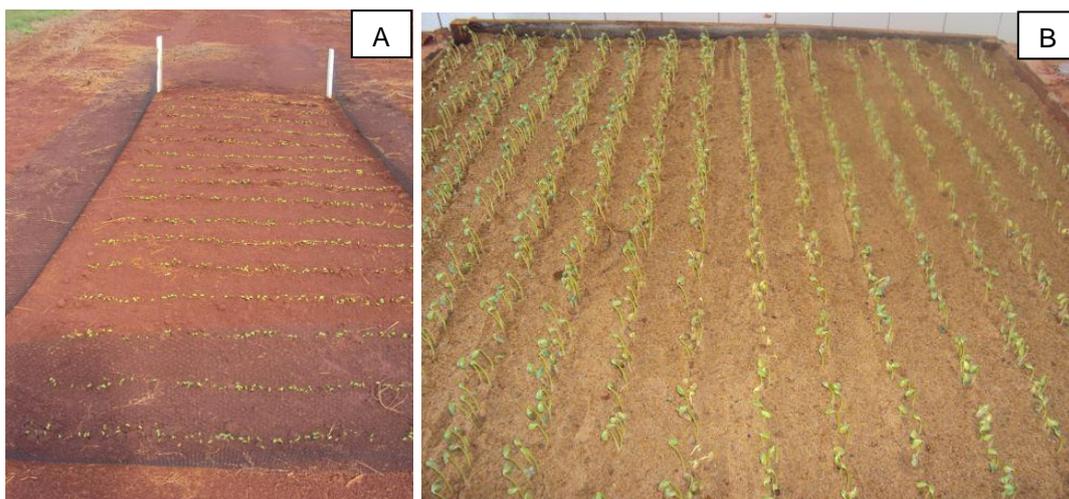


Figura 3. A) Bloco onde os ensaios foram conduzidos no solo. B) Bloco onde foram conduzidos na areia.

A segunda época de semeadura das sementes foi realizada em 18 de junho de 2013, exatos 30 dias após o primeiro ensaio. Esta avaliação em segunda época teve como objetivo comprovar que após determinado tempo que a semente recebeu o tratamento, a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* continuou presente e viável em ambas as forma de armazenamento das sementes tratadas: Hermético e galpão.

Este ensaio foi conduzido em dois canteiros distintos, com 16 linhas cada. No primeiro canteiro foram semeadas as sementes armazenadas no Hermético e no segundo canteiro as sementes que foram armazenadas no galpão. Lembrando que este mesmo procedimento foi realizado na areia, também em dois canteiros para divisão dos locais de acomodação das sementes.

4. 5 Caracterização edafoclimática do local

O solo do local onde os experimentos foram conduzidos foi caracterizado como Latossolo Vermelho fase Eutrófica. Os Latossolos Vermelho são, em sua grande maioria, de textura muito argilosa, devido à própria pobreza em material de origem (EMBRAPA 1999).

O clima de Palotina é Subtropical Úmido (segundo a classificação de Köppen), com verões quentes e invernos frios ou amenos. Geadas são frequentes no período mais frio, podendo acontecer no período entre o fim de maio e o início de setembro. A média anual de temperatura é de 20°C.

4.6 Teste de germinação de sementes de soja tratadas

Este teste tem como objetivo determinar o potencial máximo de germinação de sementes em laboratório com equipamentos que simulam as características quando semeadas no campo.

As sementes de soja ($n = 50$) foram selecionadas ao acaso em todos os tratamentos. A técnica utilizada para avaliar a germinação das sementes foi de rolos de papel de germinação, com oito repetições para cada tratamento. Depois colocadas no papel de germinação as sementes foram condicionadas no germinador onde permaneceram por cinco dias a uma temperatura de 25° C.

A metodologia para a germinação de sementes é descrita pelas Regras Análise de sementes (RAS), reformulada em 1992, e distribuída a todos os laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura.

O teste foi repetido por quatro vezes. O primeiro teste de germinação foi logo após o tratamento das sementes, realizando apenas um teste, pois as sementes ainda não haviam sido expostas aos diferentes ambientes. A repetição do teste de germinação foi a cada 15 dias, onde foram avaliadas as sementes armazenadas no Hermétrico e as sementes do galpão.

Decorridos os cinco dias de permanência no germinador, os rolos contendo as sementes, foram avaliados separadamente e três diferentes características para a germinação foram atribuídas: número de sementes normais, número de sementes anormais e de sementes mortas. Foram consideradas plântulas normais àquelas que possuíam estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis.

Ao final, os resultados foram expressos através dos valores médios (em porcentagem) para cada oito rolos com sementes analisados.

Coletas das plantas para a retirada dos nódulos e determinação da biomassa seca

Após 30 dias de semeadura, foram coletadas 20 plantas ao acaso de cada tratamento da primeira época, tanto no solo como também na areia. As mesmas foram lavadas em água corrente até a retirada total do substrato e submersas por cerca de 2 horas em água contendo hipoclorito para retiradas de impurezas.

Os nódulos foram cortados das raízes com auxílio de um bisturi e colocados em placas de Petri para facilitar a pesagem em balança analítica. Após, os nódulos foram secos em estufa a 65°C por 72 horas e pesados para a determinação da biomassa seca. Os nódulos das 20 raízes de soja de cada tratamento foram pesados em conjunto, analisando a fixação do nitrogênio por tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos nódulos das plantas cultivadas na primeira época

As sementes foram tratadas e crescidas em substrato de areia ou em solo e as raízes das plantas foram coletadas após 30 dias de plantio para avaliação dos nódulos das raízes.

As sementes que foram semeadas na areia não se desenvolveram em plantas saudáveis e não houve crescimento de nódulos nas raízes. Este fato ocorreu por condições climáticas e ambientais, sendo o substrato (areia) desprovido de matéria orgânica e de nutrientes suficientes para planta. Por outro lado, nas plantas cultivadas no solo, evidenciou-se o crescimento dos nódulos nas raízes. Após coleta dos nódulos (Figura 4) e a secagem em estufa, podemos observar na **Tabela 2**, a massa seca dos nódulos para cada tratamento.



Figura 4: Nódulos isolados de raízes de soja provenientes de sementes inoculadas com produtos comerciais à base de *Bradyrhizobium japonicum* que cresceram em substrato de solo. Fonte: o autor.

Tabela 2: Massa de nódulos secos coletados das raízes das plantas de soja, semeadas após tratamento com produtos comerciais à base de *Bradyrhizobium japonicum*.

Tratamentos	Massa de nódulos secos (mg/planta)
1(controlé)	321,40 mg
2	453,40 mg

3 (Mistura)	390,00 mg
4 (Mistura)	344,10 mg

De acordo com os valores descritos acima, pode-se observar que todos os tratamentos das sementes favoreceram a produção de nódulos nas raízes, quando comparados com as plantas controle.

Aquelas plantas provenientes das sementes de soja do tratamento 2 (inoculadas com o Produto comercial 1 que não apresenta rizóbios na sua formulação), tiveram um rendimento maior da massa de nódulos, sendo superior aos demais tratamentos. Segundo Golo et al. (2009) a não existência de diferenças significativas entre sementes tratadas e as não tratadas com inoculante comercial, é provável que o solo já disponha de populações estabelecidas de bactérias que proporcionaram boa nodulação e fixação biológica do N₂, considerando-se que, nessa área, vem sendo cultivada a soja nos últimos anos em sistema de cultivo mínimo e onde foram realizadas inoculações do rizóbio.

No tratamento 3, onde as sementes foram tratadas com a combinação de fungicida e inoculante, observa-se que a massa seca dos nódulos foi maior que a massa dos nódulos produzidos nas plantas controle. Indicando que a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* não foi prejudicada pela ação do fungicida também aplicado. Resultados semelhantes a estes foram alcançados em ensaios conduzidos pela ESALQ/USP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) que confirmam a segurança da aplicação do fungicida logo após realizar a inoculação, comprovando que não ocorre interferência na nodulação das raízes pela bactéria *Bradyrhizobium*, responsáveis pela fixação de nitrogênio.

No tratamento 4 as sementes de soja foram tratadas apenas com bactérias (Produto comercial 3 e 4) e pode-se observar que a massa dos nódulos foi semelhante à massa obtida no controle. De acordo com Yorinori (1977), cerca de 75 patógenos podem ser transmitidos pelas sementes de soja, sendo os fungos os principais organismos patogênicos (FISS et al., 2008), Desta forma, estas sementes com ausência do fungicida, puderam ter uma maior chance de parasitas inibidores da bactéria *Bradyrhizobium*.

O que podemos concluir das plantas de primeira época é que as associações, (produtos fitossanitários e formulados a base de rizóbios) não proporcionaram total alteração no desenvolvimento das plantas e nodulação. No entanto, quando

comparada com outros estudos, a nodulação observada neste experimento, mostrou-se adequada, uma vez que a massa entre 100 a 200 mg de nódulos é suficiente para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (HUNGRIA et al., 2007).

5.2 Avaliação da germinação das sementes de soja tratadas no experimento da primeira época

O teste de germinação realizado no mesmo dia que as sementes receberam os tratamentos, foram satisfatórios conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL 2009) e de acordo como demonstrado na **Tabela 3**. Observa-se que a porcentagem de germinação é semelhante a lotes que são aceitos para comercialização e o plantio. Desta forma, os tratamentos não afetaram a germinação.

Tabela 3: Teste de germinação em laboratório realizado no mesmo dia de tratamento das sementes e inoculação com os produtos comerciais à base de *Bradyrhizobium japonicum*.

Tratamentos	Característica da Semente	Porcentagem média de germinação
1 (Testemunha)	Sementes Normais	82,25%
	Sementes Anormais	16,25%
	Sementes Mortas	1,5%
Manejo 2	Sementes Normais	83,25%
	Sementes Anormais	14,75%
	Sementes Mortas	2%
Manejo 3	Sementes Normais	86,5%
	Sementes Anormais	12,75%
	Sementes Mortas	0,5%
Manejo 4	Sementes Normais	82,75%
	Sementes Anormais	14,25%
	Sementes Mortas	4,85%

Segundo Morrioni *et al.*, (2007), a germinação pode ser influenciada pelo tratamento químico e pela qualidade inicial dos lotes. Menten (1995) salienta que os efeitos do tratamento de sementes na germinação ocorrem a médio e longo prazo,

como acontece, por exemplo, com a diminuição no avanço de desenvolvimento de doenças e/ou introdução de patógenos na área.

Para o tratamento 3, obtivemos a melhor porcentagem de germinação em primeiro momento. Este resultado segundo Migliorini et al. (2012) provavelmente se deve ao fato que neste tratamento existam as combinação de fungicida e inseticida, característica este que difere este produto do demais existentes no mercado que são somente fungicidas.

5.3 Avaliação dos nódulos das plantas cultivadas na segunda época

Da mesma forma que as plantas cultivadas na primeira época, o experimento que foi realizado na areia não produziu plantas com raízes que apresentavam nódulos.

As sementes tratadas também foram semeadas em substrato de solo e os resultados não foram satisfatórios (**Tabela 4**), visto que os nódulos não alcançaram o peso ideal conforme descreve Hungria et al., (2007). Isto ocorreu pelo tempo armazenamento, o que leva a morte da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*.

Tabela 4: Massa de nódulos secos coletados das raízes das plantas de soja, semeadas após tratamento com produtos comerciais à base de *Bradyrhizobium japonicum*. Comparação de dois ambientes de armazenamento das sementes.

Local de Armazenamento	Tratamentos	Massa de nódulos secos (mg/planta)
Galpão	1(controle)	83,1 mg
	2	73,1 mg
	3 (Mistura)	64,4 mg
	4 (Mistura)	55 mg
Hermético	1(controle)	-
	2	28,6mg
	3 (Mistura)	64,2 mg
	4 (Mistura)	22 mg

Comparando-se as amostras armazenadas no galpão com as amostras armazenadas no hermético, observaram-se melhores resultados nas sementes que foram armazenadas no galpão. Os resultados apresentados são decorrentes de

temperaturas elevadas a qual as sementes foram expostas no galpão, o que leva a maior proliferação das bactérias.

Segundo Nogueira (Embrapa 2012) vários ensaios conduzidos com Soja evidenciam a diminuição drástica quando realizado a pré-inoculação das sementes vários dias antes da semeadura, visando facilitar a operação. O pesquisador observou problemas sérios relacionados à pré-inoculação, o que tem levado a uma baixa sobrevivência dos rizóbios nas sementes quando a operação é realizada com antecedência, ainda que com aditivos protetores de bactérias. Como consequência, temos uma baixa nodulação ou uma nodulação mais tardia, ou seja, as bactérias que conseguem colonizar as raízes da soja, chegando mais tardiamente na raiz, realizando a fixação biológica do nitrogênio na planta mais tardiamente também. Então, isso leva a um prejuízo de acúmulo de nitrogênio na planta, refletindo em perdas de produtividade, detalha o pesquisador da Embrapa Soja.

5.4 Avaliação da germinação das sementes de soja tratadas no experimento da segunda época

De acordo com os resultados laboratoriais da germinação das sementes tratadas, apenas o tratamento 1 (controle) armazenado no hermético não obteve porcentagem mínima, os demais tratamentos foram satisfatórios em ambos os locais de armazenamento (**Tabelas 5 e 6**).

Tabela 5: Teste de germinação (avaliação quinzenal) das sementes de soja tratadas com produtos comerciais a base de rizóbios e armazenadas no Hermético.

Tratamentos	Característica da Semente	Porcentagem de germinação		
		1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação
1 (controle)	Sementes Normais	81,5%	79,75%	76,75%
	Sementes Anormais	17,5%	19%	22,25%
	Sementes Mortas	1%	1,25%	1%
2	Sementes Normais	83,25%	82,5%	81,25%
	Sementes Anormais	15,5%	16,25%	15%
	Sementes Mortas	1,25%	1,25%	3,75%
3 (Mistura)	Sementes Normais	80,75%	83,5%	82,75%
	Sementes Anormais	18,5%	14,5%	13,75%

	Sementes Mortas	0,75%	2%	3,5%
4 (Mistura)	Sementes Normais	82%	83,5%	86,5%
	Sementes Anormais	18%	15,25%	11,25%
	Sementes Mortas	0%	1,25%	2,25%

Tabela 6: Teste de germinação (avaliação quinzenal) das sementes de soja tratadas com produtos comerciais a base de rizóbios e armazenadas em galpão.

Tratamentos	Característica da Semente	Porcentagem de germinação		
		1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação
1 (controle)	Sementes Normais	80,75%	83,5%	85,5%
	Sementes Anormais	18%	14,75%	12,75%
	Sementes Mortas	1,25%	1,75%	1,75%
2	Sementes Normais	87,5%	87%	87%
	Sementes Anormais	11,25%	12%	11,25%
	Sementes Mortas	1,25%	1%	1,75%
3 (Mistura)	Sementes Normais	86,5%	87,75%	84%
	Sementes Anormais	12,25%	11%	10,75%
	Sementes Mortas	1,25%	1,25%	5,25%
4 (Mistura)	Sementes Normais	88,75%	85,5%	84,75%
	Sementes Anormais	10,5%	14%	11,25%
	Sementes Mortas	0,75%	0,5%	4%

É possível observar, que mesmo após os tratamentos e período de armazenamento, com exceção das sementes controle armazenadas no hermético, as sementes apresentaram boa porcentagem de germinação e não influenciou os baixos valores obtidos com a massa seca dos nódulos.

Para os resultados de germinação em que a porcentagem de sementes normais se diferem entre 1% a 5 % no mesmo tratamento, podemos considerar que não ocorreu qualquer teste de pureza das sementes antes de serem germinadas, ou uma classificação para retirada de sementes quebradas. O cultivar escolhido pode ter sofrido dano durante o transporte, secagem, tratamento e beneficiamento, em que as sementes passam por elevadores, transportadores e máquinas, sofrendo

quedas, impactos e abrasões que causam lesões ou danos no tegumento, endosperma e embrião.

Além dos danos visíveis representados por rachaduras, quebras e sementes fragmentadas, as sementes severamente danificadas podem sofrer reduções na qualidade fisiológica. Pode haver redução no poder germinativo logo após a incidência do dano, efeitos imediatos, ou podem ocorrer efeitos latentes, os quais se manifestam após períodos variáveis de armazenamento (POPINIGIS, 1977).

Silveira (1974) realizando testes em milho concluiu que quanto maior a velocidade angular do cilindro trilhador maior a porcentagem de sementes quebradas, e que a qualidade fisiológica e vigor foram afetados pelos danos mecânicos, bem como a produção de sementes (kg/ha).

O polímero utilizado para aderência dos produtos comerciais nas sementes não interferiu na germinação. Inicialmente, essa técnica foi empregada pelos chineses para evitar que sementes de arroz flutuassem, mas o revestimento, como tecnologia de proteção, desenvolveu-se para melhorar a precisão de plantio, modificando o tamanho e o formato de sementes irregulares e, desta maneira, aumentar a plantabilidade das mesmas sem afetar o poder germinativo dessas (BACON & CLAYTON, 1986; MAUDE, 1998; SILVEIRA, 1998).

Para o teste de germinação foi possível constatar que, independentemente da época do tratamento, os tratamentos fungicidas não provocaram nenhum efeito negativo germinação, esses resultados são afirmados em testes realizados por Scheeren et al. (2003). Zorato e Henning (2001), demonstraram não haver influência negativa dos tratamentos antecipados com fungicidas na qualidade de sementes de soja de dois cultivares em diferentes épocas de armazenamento.

6 ANÁLISE CRÍTICA SOBRE O ESTÁGIO

As atividades desenvolvidas dentro do laboratório estão enquadradas nas normas MAPA, com laboratoristas e corpo técnico qualificado, levando a total confiabilidade ao produtor ao adquirir a semente.

O local de condução dos experimentos possui boas condições de avaliação, amplo espaço e disponibilidade de equipe para auxiliar nos testes.

7 CONCLUSÕES

- As condições climáticas da época não foram apropriadas e devido a falta de substrato, não houve nodulação nas plantas cultivadas em areia;
- O tratamento com fungicida/inseticida não teve influência sobre as bactérias inoculadas;
- Os dados obtidos neste trabalho, mostraram que o tratamento de sementes com fungicida e inoculante seguido de armazenamento (por 30 dias) antes do plantio não é um método viável quando se deseja obter maiores rendimentos no plantio pois as bactérias inoculadas podem perder a sua viabilidade. Isso foi evidenciado no plantio em solo em segunda época, onde as sementes armazenadas no hermético não demonstraram, em nenhum tratamento, peso suficiente de nódulos com capacidade de fixar N na planta.
- Um maior tempo para coleta das amostras de segunda época, pode ser uma alternativa para obtenção de maior rendimento dos nódulos.
- A germinação das sementes não foi influenciada pelos tratamentos e nem pelo armazenamento.

8 REFERÊNCIAS

- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- 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. 141-145, 1998.
- ANNAPURNA, K. *Bradyrhizobium japonicum*: Survival and nodulation of soybean as influenced by fungicide treatment. **Indian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 305-307, 2005.
- ARAÚJO, F.F.; CARVALHO, F.G. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus Subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.9, p.1633-1643, set. 2006.
- BACON, J.R.; CLAYTON, P. B. Protection for seeds: a new film coating technique. **Span**, Derby, v. 29, p. 54-56, 1986.
- BIKROL, A.; SAXENA, N.; SINGH, K. Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 667-671, 2005.
- BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.381-393, 1999.
- BHUVANESWARI, T.V. et al. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**. Rockville, v.66, p. 1027-1031, 1980.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 398p. 2009.
- BROUGHTON, W. J. et al. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 129–137, may 2003.
- CAMPOS, R. J.; HUNGRIA, M.; A Inoculação da Soja. Londrina: Embrapa- CNPSo. 28p. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 17; EMBRAPA CPAC. Circular Técnica, 34). 2007.
- CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-
semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.3, p.335-338, mar. 2005.
- COSTA NETO, P. R. & ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, p. 4, 2000.

- DELOUCHE, J.C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília, DF: AGIPLAN. 103p. 1976.
- DENISON, R. F.; HARTER, B. L. Nitrate Effects on Nodule Oxygen Permeability and Leghemoglobin - **Nodule Oximetry and Computer Modeling**. *Plant Physiol.* 107: 1355–1364. 1995
- DROZDOWICZ, A.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 17-67. 1997.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, Produção de informação, 412 p. 1999.
- EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2001**. Londrina: Embrapa-CNPSO. 199 p. 2001
- EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, 370p. 2004
- FAGAN, E.B. et al. Fisiologia da Fixação Biológica do Nitrogênio em Soja. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.38, n.7, p.835-842, 2003.
- FISS, G. et al. Desempenho de sementes de soja submetidas a tratamento com fungicidas químicos e bioprotetores. **XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-graduação**, Pelotas – RS. 2008.
- FRANCO, M.C. et al. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e mesoamericano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1145-1150, 2002.
- FRANCO, A.A.; NEVES, M.C.P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, p.257-282. 1992.
- GRAHAM, T.L. Flavonoid and flavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, Washington, v. 95, p. 594-603, 1991.
- GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, n.3, p.872-877, 2003.
- GERAHTY, N.; et al. Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. **Plant Science**, v.58, p.1-7. 1992.
- GOLO, A.L. et al. **Qualidade das sementes de soja com a aplicação de diferentes doses de molibdênio e cobalto**. Revista brasileira de sementes vol.31 no.1 Londrina – Pr. 2009.

HAMPTON, J.M.; TEKRONY, D.M. **Handbook of vigour test methods**. Zürich: ISTA, 117p. 1995.

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

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

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

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

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

HUGHES, D. Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. **Genome Biology**, London, v.1, n.6, p.1-8, 2000.

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

HUNGRIA, M. et al. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto. **brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80 p. (Embrapa Soja. **Documentos**, 283). 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: **Congresso Brasileiro de Ciência Do Solo**. Recife, 2005.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. Edição **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Embrapa-CPAC, Planaltina. p.189-295. 2007.

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

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

KUYKENDALL, L.D. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium Japonicum* Jorda (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium Elkanii* sp. Nov. Canadian Journal of Microbiology, v. 38, p. 501-505, 1992.

KÖPPEN, W. et al. Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes. Wall-map 150cmx200cm. 1928.

LADHA, J.K.; REDDY, P.M. nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil** n. 252, p. 151 – 167, 2003.

MAUDE, R. Progressos recentes no tratamento de sementes. In: Seminário Panamericano de Semillas, 15.Gramado. **Memória. Passo Fundo: Comissão Estadual de Sementes e Mudanças do Rio Grande do Sul**, p. 99-106. 1998.

MARCOS FILHO, J. et al. Teste de vigor: importância e utilização. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina : ABRATES, 218p. Cap.1, p.1-21. 1999.

MARRONI, I. V. et al. Efeito dos tratamentos químico e biológico de sementes de mamona sobre a germinação, emergência e produção de massa seca. In: Simpósio Estadual de Agroenergia, 1., 2007, Pelotas. Embrapa Clima Temperado. 2007.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, 1995.

MIGLIORINI, P. Efeito do Tratamento Químico e Biológico na Qualidade Fisiológica e Sanitária de Sementes de Canola. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 7 8 8, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 729p. 2006.

MYLONA, P. et al. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, julho de 1995.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 289p. 1977.

ROMERO, E. M. et al. Cepas mejoradas de *Rhizobium*. **Investigación y Ciencia**, n. 8, p. 14 – 19, 1998.

RYLE ,G.J. A. et al. The respiratory costs of nitrogen fixation in soyabean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

SILVEIRA, J.F. da. **Efeitos da debulha mecânica sobre germinação, vigor e produção de cultivares de milho (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 47p. Tese de Mestrado. 1974.

SILVEIRA, S. Recobertura como medida para proteção da semente. **SeedNews**, Pelotas, n. 5, p. 34-35, 1998.

SCHEEREN, B. R. Armazenamento de sementes de soja pelo sistema a frio no Centro – Oeste do Brasil. Pelotas, 1995. 86p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia - Ciência & Tecnologia de Sementes) - FAEM/UFPel, 1995.

STACEY , M.G. et al. Expression analyses of Arabidopsis oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta* 223 : 291 – 305. 2006.

STANLEY, J. S. et al. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.163, n.2, p.148-154, 1985.

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

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

SCHAEFER, C.E. et al. Roteiro da excursão pedológica Viçosa-Sete Lagoas. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 25. Viçosa, SBCS/DPS - UFV/EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisas de Solos. Viçosa, 47p. 1995.

SMITH, D.L., HUME, D.J. Comparison of assay methods for N₂ fixation utilizing white bean and soybean. **Canadian Journal Plant Science**, v.67, p.11-19, 1987.

TSAI, S.M. et al. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, v.152, p.131-138, 1993.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. Fisiologia vegetal. Trad. **SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed.**, Porto Alegre: Artemed, p.719. 2004

WILLEMS. A. The taxonomy of rhizobia: Na overview. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Springer, pp 3-14. 2007.

YORINORI, J. T. Doenças da soja. **A soja no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, p. 159-193. 1977