



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO FERNANDES RODRIGUES

**IMPACTO DE AGROTÓXICO COM FUNGICIDA E
INSETICIDA EM ATRIBUTOS DE *Bradyrhizobium* spp. E NA
SIMBIOSE COM A SOJA**

Londrina
2020

THIAGO FERNANDES RODRIGUES

**IMPACTO DE AGROTÓXICO COM FUNGICIDA E
INSETICIDA EM ATRIBUTOS DE *Bradyrhizobium* spp. E NA
SIMBIOSE COM A SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Mariangela Hungria

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R696a Rodrigues, Thiago.
Impacto de agrotóxico com fungicida e inseticida em atributos de *Bradyrhizobium* spp. e na simbiose com a soja / Thiago Rodrigues. - Londrina, 2020.
71 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio - Tese. 2. Biotecnologia - Tese. 3. Tratamento de sementes - Tese. 4. Inoculante - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

THIAGO FERNANDES RODRIGUES

**IMPACTO DE AGROTÓXICO COM FUNGICIDA E
INSETICIDA EM ATRIBUTOS DE *Bradyrhizobium* spp. E NA
SIMBIOSE COM A SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria
Embrapa – SOJA

Prof. Dr. Marco Antônio Nogueira
Embrapa – SOJA

Prof. Dr. Artur Berbel Lirio Rondina
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2020.

À Dona Zizinha (*in memoriam*), minha alegria, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sou agradecido aos meus pais, Vania e Cassio, pela louvável forma de me fazerem acreditar em mim mesmo, porque me incentivam, apoiam e expressam confiança nas minhas decisões.

Registro também meu agradecimento ao meu irmão, Túlio, pela companhia nesses dois anos em que estivemos distanciados fisicamente de nossas origens.

Agradeço à pessoa que me conduziu nos primeiros passos dentro de um laboratório e que me serviu de inspiração e referência, me orientando e aconselhando sobre decisões a serem tomadas, Dra Claudia Campos.

Agradeço aos meus amigos de graduação, Camila, Desireé e William, que, durante todo esse período, mesmo a uma distância tão grande, estiveram prontos para me ouvir, em tristeza ou alegria. Nos mantemos unidos e cooperando uns com os outros nas adversidades que nos acometem.

Tenho imensa gratidão à Dra Mariangela Hungria, minha orientadora, que, mesmo sem me conhecer, abriu as portas do seu laboratório e me recebeu de braços abertos confiando a mim a verificação de hipóteses que levantara ao longo de suas pesquisas. Agradeço pela oportunidade, pelo que me ensinou, pelos conselhos e por cada palavra dita, muitas vezes em situações informais, mas que me serviram de inspiração.

Agradeço aos funcionários da Embrapa soja que trabalham no Laboratório de Biotecnologia do Solo, Dr Marco, Dr Renan, Lígia, Eduara, Rinaldo e dona Rosa (que se aposentou no meio desse período), por todo apoio técnico. Agradecimento especial à Eduara, porque de maneira atenciosa e paciente me ensinou e me acompanhou de perto nos primeiros momentos da minha pesquisa, sem o seu suporte, minha adaptação ao laboratório teria sido muito mais árdua.

Eu sou grato aos meus colegas de laboratório, pois todos de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pelo espírito de cooperatividade que guardam dentro de si.

Faço menção especial aos meus amigos do laboratório que me ajudaram de maneira ainda mais ativa no desenvolvimento desta dissertação de mestrado: Flávia, Paloma, Alisson, Fernanda, Artur, Luísa, Mariana e Amanda.

Agradeço aos pioneiros na pesquisa com FBN e microrganismos promotores do crescimento vegetal no Brasil, pois seus trabalhos me inspiram, fazem com que eu me sinta parte da história e me motivam a lutar para continuar atuando nesta área.

Sou grato à Embrapa Soja por disponibilizar toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEL.

Agradeço à CAPES pelo concedimento da bolsa de Mestrado, sem a qual não conseguiria ter chegado até o fim.

Por fim, agradeço a quem me suportou nas angústias e sofrimentos, que me consolou e foi o motivo da minha alegria. Agradeço a Deus por, mais uma vez, me permitir colocar sobre ele a minha fé

*“O papel dos infinitamente pequenos
na natureza é infinitamente grande”*
Pasteur, L.

RODRIGUES, Thiago Fernandes. **Impacto de agrotóxico com fungicida e inseticida em atributos de *Bradyrhizobium* spp. e na simbiose com a soja.** 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] possui grande relevância econômica e nutricional pelo alto teor proteico. As necessidades dessa leguminosa em N podem ser supridas pela simbiose com algumas bactérias que estabelecem o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e são utilizadas como inoculantes para promoção do crescimento vegetal. A utilização de agrotóxicos no tratamento das sementes, porém, pode afetar negativamente o desempenho dessas bactérias. Neste trabalho avaliaram-se, em ensaios de laboratório, casa de vegetação e a campo, impactos do agrotóxico StandakTop™ nas estirpes SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* e na simbiose com a soja. O tratamento combinado de sementes de soja com StandakTop™ e *Bradyrhizobium* spp. reduziu o número de células viáveis aderidas às sementes em ambas as estirpes, em relação às sementes não tratadas com o agrotóxico, sendo o efeito ainda mais drástico com o armazenamento por períodos prolongados de tempo, com inexpressivo número de células viáveis remanescentes aos 30 dias de armazenamento. O tratamento com StandakTop™ resultou em alterações morfológicas em ambas estirpes, com diminuição no diâmetro de colônias de células recuperadas de sementes. Esse efeito, porém, foi reversível. O contato de StandakTop™ por até 15 dias não resultou em alterações nos perfis de DNA amplificados por BOX-PCR de ambas estirpes. O tratamento com StandakTop™ não resultou em diferenças na eficiência da nodulação e em outros parâmetros da simbiose em ensaio conduzido em casa de vegetação. A campo, em experimentos conduzidos em Paranavaí-PR e Lutécia-SP, de um modo geral o tratamento com StandakTop™ não afetou parâmetros simbióticos no estágio vegetativo; contudo, na maturidade fisiológica, o agrotóxico reduziu significativamente o rendimento de grãos em Paranavaí nos tratamentos recebendo N-mineral ou coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* e, principalmente, o N total nos grãos, nos dois locais, em todos os tratamentos, inoculados ou recebendo N-mineral, indicando um impacto negativo do agrotóxico no metabolismo do N e/ou na remobilização do N nas plantas, efeito esse que precisa ser melhor investigado.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio; biotecnologia; tratamento de sementes; inoculante; coinoculação.

RODRIGUES, Thiago Fernandes. **Impact of pesticide with fungicide and insecticide in attributes of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiosis with the soybean**. 2020. 70 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] has a great economic and nutritional relevance due to its high protein content. The needs of this legume in N can be met by the symbiosis with some bacteria that establish the biological nitrogen fixation process (BNF) and are used as inoculants to promote plant growth. The use of pesticides in seed treatment, however, can negatively affect the performance of the bacteria. In this study we evaluated, in experiments performed under laboratory, greenhouse and field conditions, the impacts of the pesticide StandakTop™ on strains SEMIA 587 of *Bradyrhizobium elkanii* and SEMIA 5079 of *Bradyrhizobium japonicum* and on the symbiosis with the soybean. The combined treatment of soybean seeds with StandakTop™ and *Bradyrhizobium* spp. reduced the number of viable cells adhered to the seeds in both strains, in relation to the seeds not treated with the pesticide, the effect being even more drastic with the storage for prolonged periods of time, with inexpressive number of viable cells remaining at 30 days of storage. Treatment with StandakTop™ resulted in morphological changes in both strains, with a decrease in the diameter of colonies of the cells recovered from seeds. This effect, however, was reversible. The contact of StandakTop™ for up to 15 days did not result in changes in the DNA profiles amplified by BOX-PCR of both strains. The treatment with StandakTop™ did not result in differences in the efficiency of nodulation and in other parameters of the symbiosis in an experiment performed in greenhouse conditions. In the field, in experiments conducted in Paranavaí-PR and Lutécia-SP, in general the treatment with StandakTop™ did not affect symbiotic parameters in the vegetative stage; however, at physiological maturity, the pesticide significantly reduced the grain yield in Paranavaí in the treatments receiving mineral-N or coinoculated with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum brasilense* and, mainly, the total N in the grains, in both sites, in all treatments, inoculated or receiving mineral-N, indicating a negative impact of the pesticide on the N metabolism and/or N remobilization in plants, an effect that needs to be further investigated.

Key words: biologic nitrogen fixation; biotechnology; seed treatment; inoculant; coinoculation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Evolução da produção da soja nos estados do Paraná, Mato Grosso e Rio Grande do Sul 19
- Figura 2** – Infecção e invasão do rizóbio nos tecidos radiculares de planta leguminosa para desenvolvimento dos nódulos. (1) A bactéria se adere ao tricoma radicular causando seu encurvamento induzido pelo fator Nod. (2) Degradação da parede celular e invaginação da membrana formando o cordão de infecção. (3) Alongamento do cordão de infecção. (4) Durante a infecção, forma-se uma ponte citoplasmática nas células corticais para direcionar o alongamento do cordão de infecção. (5) Quando o cordão de infecção alcança uma célula cortical a membrana do cordão colapsa com a membrana da célula liberando os rizóbios na célula para formar uma organela especializada em fixação do nitrogênio denominada simbiossomo 22
- Figura 3** – Venda de doses de inoculantes no Brasil de 2009 a 2018..... 26
- Figura 4** – Esquema do delineamento experimental para cada tratamento na recuperação das células dos rizóbios nas sementes. A, B e C: repetições contendo 100 sementes cada. Dx, Dy e Dz: diluições 36
- Figura 5** – Fluxograma do método adotado para contagem e análise da morfologia das colônias e isolamento para experimento em casa de vegetação..... 39
- Figura 6** – Dados climáticos mensais nas regiões experimentais durante o período dos ensaios. (a) Lutécia-SP, (b) Paranavaí-PR. Informação obtidas pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>) e pela estação agrometeorológica do Instituto Agrônomo do Paraná (www.iapar.br) 44
- Figura 7** – Sobrevivência de (a) *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 em sementes de soja, na presença ou ausência de agrotóxico, e com diferentes tempos de armazenamento. Os dados representam médias de três repetições. As barras verticais representam o desvio padrão 47

- Figura 8** – Regressão linear do logaritmo de número de células de (a) *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 recuperadas de sementes de soja. Fórmulas matemáticas em cinza escuro representam as funções lineares nos tratamentos sem agrotóxico, fórmulas em cinza claro representam funções lineares nos tratamentos com agrotóxico. Pelo teste de razão de probabilidade, houve diferença significativa entre as inclinações das retas dos tratamentos com e sem agrotóxico nas duas espécies, $p < 0,05$ 48
- Figura 9** – Diâmetro médio das colônias formadas pelas bactérias (a) *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5079 recuperadas de sementes armazenadas durante diferentes períodos sem e com agrotóxico. Os dados representam médias de três repetições em cada tratamento..... 49
- Figura 10** – Diâmetro médio de UFCs de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 provenientes de colônias isoladas após os terem sido inoculadas em sementes de soja tratadas ou não com agrotóxico e armazenadas por 15 dias. As colunas vazias representam o diâmetro médio de colônias formadas por bactérias que não estiveram em contato com sementes (C: controle). As barras verticais representam o desvio padrão. Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com $n = 3$ 49
- Figura 11** – Análises de *fingerprinting* por BOX-PCR de bactérias recuperadas de sementes em diferentes períodos de armazenamento (2 h, 7 d, 15 d). (a) *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 (b) *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079. Com: bactéria proveniente de sementes tratadas com agrotóxico; Sem: bactérias provenientes de sementes não tratadas com agrotóxico; Controle: Bactérias que não foram recuperadas de sementes 51
- Figura 12** –Atributos de plantas de soja cultivadas no experimento em casa de vegetação: (a) valor SPAD, (b) N total na parte aérea, (c) massa da parte aérea seca, (d) massa da raiz seca, (e) número de nódulos, (f) massa dos nódulos secos. No eixo das abscissas: (NI) não

inoculado, (5079) inoculado com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, (587) inoculado com *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587. Legendas: (NI) controle não inoculado, (I-0) inoculado no dia da semeadura, (I-15) inoculado com bactérias recuperadas de sementes armazenadas após 15 dias de inoculação, (I-15+ST) inoculado com bactérias recuperadas de sementes tratadas com StandakTop™ e armazenadas após 15 dias de inoculação. As barras verticais indicam o desvio padrão 53

Figura 13 – Mapas de calor correlacionando as variáveis e tratamentos obtidos nos experimentos em (a) Paranavaí-PR e (b) Lutécia-SP, na safra 2018/2019. As linhas agrupam tratamentos e colunas agrupam variáveis. NI: não inoculado, I: inoculado com *Bradyrhizobium*, I + Azo: coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. NN: número de nódulos, MN: massa dos nódulos, MPA: massa da parte aérea seca, cN: concentração de N, NTPA: N total na parte aérea, R: Rendimento, NG: nitrogênio nos grãos 61

Figura 14 – Análise das componentes principais que descrevem os resultados dos experimentos realizados em (a) Paranavaí-PR e (b) Lutécia-SP, na safra 2018/2019. NI: não inoculado, I: inoculado com *Bradyrhizobium*, I + Azo: coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. NN: número de nódulos, MN: massa dos nódulos, MPA: massa da parte aérea seca, cN: concentração de N, NTPA: N total na parte aérea, R: Rendimento, NG: nitrogênio nos grãos..... 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeito de alguns agrotóxicos sobre características de diversos microrganismos diazotróficos e na interação com plantas 31
- Tabela 2** – Características químicas do solo, nas camadas de 00-20 cm, antes da semeadura, nos experimentos realizados em Paranaíba-PR e Lutécia-SP, na safra 2018/2019 45
- Tabela 3** – Médias das variáveis analisadas nos experimentos em Paranaíba-PR e Lutécia-SP, na safra 2018/2019 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAE	Dias após a emergência
D.O.	Densidade Óptica
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IPAGRO	Instituto de Pesquisas Agronômicas
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
I	Inoculado com <i>Bradyrhizobium</i>
I + Azo	Inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i>
N	Nitrogênio
NI	Não inoculado
NI + N	Não inoculado com fertilizante nitrogenado
Nod	Fator de nodulação
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
SMA	<i>Standardized Major Axis</i>
UFC	Unidade(s) formadora(s) de colônia(s)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1.	HISTÓRICO DA CULTURA DA SOJA	19
2.2.	FONTES DE NITROGÊNIO	21
2.3.	A IMPORTÂNCIA DA FBN PARA A CULTURA DA SOJA.....	22
2.4.	HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA FBN NO BRASIL	23
2.5.	TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM INOCULANTES E AGROTÓXICOS.....	28
3.	OBJETIVOS	33
3.1.	OBJETIVO GERAL	33
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4.	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1.	PREPARO DOS INÓCULOS PARA O TRATAMENTO DAS SEMENTES.....	34
4.2.	RECUPERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE SOJA INOCULADAS	34
4.3.	CONTAGEM E ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS	36
4.3.1.	Análise Estatística	36
4.4.	CRIOPRESERVAÇÃO E MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS RECUPERADAS.....	37
4.5.	ANÁLISE DE FINGERPRINTING	37
4.6.	VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA NODULAÇÃO E FBN DAS UFC RECUPERADAS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CASA DE VEGETAÇÃO	40
4.6.1.	Preparo Do Inóculo.....	40
4.6.2.	Desinfestação Da Superfície Das Sementes.....	40
4.6.3.	Semeadura E Inoculação	40
4.6.4.	Análise Estatística	41
4.7.	EXPERIMENTO EM CAMPO	42
4.7.1.	Descrição Dos Locais, Preparo Da Área, Semeadura E Condução Dos Ensaios	42
4.7.2.	Amostragens E Análises.....	46

4.7.3.	Análise Estatística	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	RECUPERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE SOJA INOCULADAS	47
5.2.	ANÁLISES DE FINGERPRINTING	50
5.3.	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	52
5.4.	ENSAIOS EM CAMPO	54
6.	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma planta nativa da China, onde a cultura emergiu há mais de 3000 anos. Espalhou-se para regiões do Leste asiático, onde foi encontrada pelos primeiros europeus que viajavam pelo continente. No Brasil, foi introduzida no final do século XIX, entretanto, somente a partir da década de 1960 o país vivenciou o início da utilização da soja como produto comercial. Hoje o cultivo da soja no Brasil constitui uma das mais importantes atividades do ponto de vista econômico no país (HYMOWITZ, 2008; EMBRAPA, 2013).

A cultura da soja possui alta demanda por nitrogênio (N). Apesar do ar atmosférico ser constituído majoritariamente por N₂, as plantas não são capazes de absorver e assimilar o N desta molécula. Por isso, atenção deve ser dada ao fornecimento de N para a cultura. Fertilizantes nitrogenados demonstram-se pouco viáveis, devido ao baixo aproveitamento pelas culturas, ao alto custo do insumo e ao impacto ambiental elevado em sua produção, transporte e uso (HUNGRIA et al., 2005).

A natureza conta com algumas espécies de bactérias e arqueias capazes de metabolizar o N₂ em formas assimiláveis pelas plantas e outros produtores primários, realizando o processo denominado fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esses microrganismos também são conhecidos como diazotróficos. Algumas dessas bactérias, denominadas coletivamente como rizóbios, estabelecem simbioses com hospedeiros específicos, como é o caso da soja, havendo a formação de estruturas típicas, em geral nas raízes, os nódulos (HUNGRIA et al., 2005). No caso da soja, bactérias do gênero *Bradyrhizobium* têm sido utilizadas como inoculantes pois, via FBN, fornecem N assimilável para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006a).

A utilização de agrotóxicos no tratamento de sementes de soja pode impactar a eficiência da nodulação e do processo de FBN (CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009). Foi observado que o tratamento de sementes com inoculantes e agrotóxicos resulta num menor número de células viáveis aderidas nas sementes em relação às sementes tratadas apenas com inoculantes. Além disso, maiores tempos de exposição dos inoculantes a agrotóxicos nas sementes causam reduções ainda mais drásticas no número de células viáveis de rizóbios (FERREIRA et al., 2011). Por sua vez, o tratamento de sementes de soja com agrotóxicos promove o melhor

estabelecimento das plantas, protegendo as sementes contra patógenos presentes no solo, tornando-se essencial em determinadas situações (EMBRAPA, 2013). Portanto, a compatibilização entre os tratamentos de sementes de soja com inoculantes e agrotóxicos suscita esforços direcionados a melhores entendimentos sobre o tema e para a mitigação dos prejuízos causados por esses agrotóxicos no desempenho da tecnologia de inoculação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO DA CULTURA DA SOJA

O gênero *Glycine* pertence à família Leguminosae (=Fabaceae) e abarca dois subgêneros. O primeiro (*Glycine*) possui 28 espécies, além de outras 10 ainda não classificadas (NCBI, [s.d.]). O segundo subgênero (*Soja*) é composto por três espécies:- 1- *G. max* (L.) Merr. é a soja domesticada, possui altura média de 1 m e o peso de cada 100 sementes é de, aproximadamente, 15 g; 2- *G. soja* Siebold & Zucc. representa a soja selvagem, sua altura alcança cerca de 4-6 m e o peso de 100 sementes está entre 0,5 e 3 g; 3- *G. gracilis* Skvortso possui morfologia intermediária entre duas primeiras (WANG et al., 2015). A palavra *Glycine* tem origem no grego, *glykys* (doce) e, provavelmente, refere-se aos tubérculos comestíveis produzidos por *G. apios* L., hoje *Apios americana* Medik (revisado em HYMOWITZ, 2008).

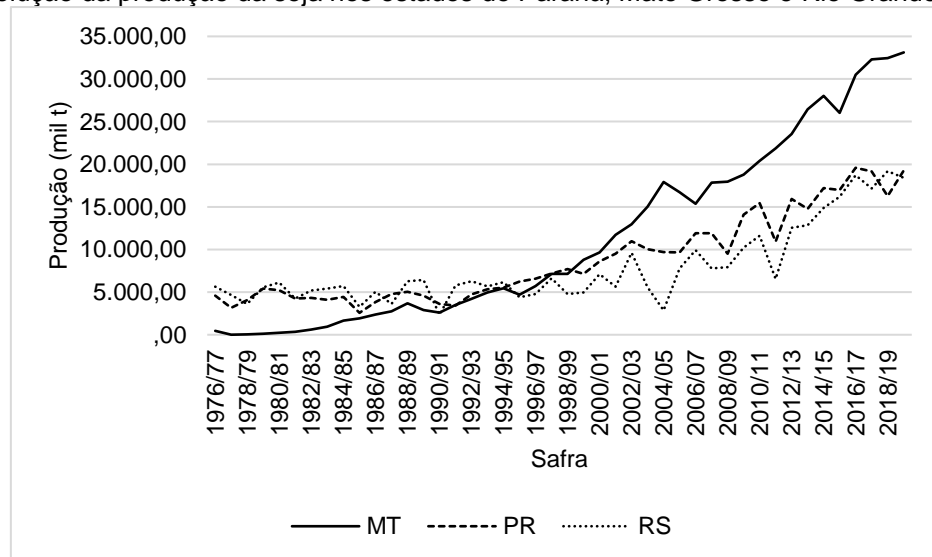
A soja é uma planta nativa da China e sua domesticação iniciou-se na região oriental do norte chinês na época da Dinastia Zhou (1125-256 a.C.). Entretanto, na Dinastia Shang (1766-1125 a.C.), tentativas de domesticação da espécie já haviam sido feitas. Entre os séculos V e XV d.C. a soja foi introduzida em outras regiões da Ásia, como a Indonésia, Japão, Malásia, Myanmar, Nepal, Norte da Índia, Filipinas e Tailândia. Missionários e viajantes europeus experimentaram pela primeira vez alimentos derivados de soja no período entre os séculos XIII e XV. Os produtos derivados da soja, como o molho de soja, chegaram no continente europeu através do comércio no século XV. A soja foi introduzida no continente Europeu provavelmente pouco antes de 1737, quando Linneaus a descreveu em *Hortus Cliffortianus*, escrito com base em plantas cultivadas num jardim em Harterkamp, na Holanda. Em 1740 sementes de soja foram semeadas no *Jardin des Plantes*, em Paris, França. As primeiras sementes de soja chegaram aos Estados Unidos da América na segunda metade do século XVIII (HYMOWITZ, 2008).

No Brasil, a soja foi introduzida no Estado da Bahia, em 1882, na Escola Baiana de Agricultura em São Bento das Lajes e, no mesmo ano, foram relatados no Jornal do Agricultor os resultados dos primeiros testes com algumas variedades no Brasil. Além disso, na época, o jornal distribuiu sementes gratuitamente aos assinantes (D'UTRA, 1882). No Rio Grande do Sul os primeiros relatos sobre a soja foram feitos por Minsén (1901) (citado em BONATO; BONATO 1987) e, em 1941, foi construída

nesse Estado a primeira fábrica de processamento de soja. Em 1949 o Brasil começou a aparecer nas estatísticas internacionais como produtor de soja, entretanto, somente na década de 1960 o país vivenciou o início da utilização da soja como produto comercial. O primeiro registro histórico da soja no Estado do Paraná data de 1936, entretanto, a cultura não teve grande expansão até o início da década de 1950. A cultura do café no Paraná foi impactada por geadas que ocorreram em 1953 e 1955 e, para equilibrar o custeio da renovação dos cafezais, foi adotado o método de cultivo intercalar utilizando cereais. Na geada de 1955 a utilização da soja foi sugerida como cultivo intercalar e, a partir de então, a produção no Paraná foi crescendo, de modo que, na safra 1956/57, o Estado assumia a posição de segundo maior produtor de soja no país (BONATO; BONATO 1987; HUNGRIA et al. 2005; EMBRAPA, 2013).

Hoje o Paraná ainda ocupa a posição de segundo maior produtor de soja no país, ficando atrás do Estado do Mato Grosso, que vivenciou um crescimento expressivo da sojicultura a partir da década de 1970 (Figura 1). Apesar de possuir a segunda maior produção nacional, o Paraná é o estado brasileiro com a maior produtividade do país (3.509 kg ha⁻¹ na safra 2018/19). Mato Grosso obteve, na mesma safra, uma produtividade de 3.327 kg ha⁻¹, a segunda maior do país. Nessa safra o Brasil produziu, aproximadamente, 120,4 milhões de toneladas, ocupando a posição de segundo maior produtor do mundo (CONAB, 2019).

Figura 1 – Evolução da produção da soja nos estados do Paraná, Mato Grosso e Rio Grande do Sul.



Fonte: Conab, 2019.

2.2. FONTES DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) está presente em muitas biomoléculas, principalmente ácidos nucleicos e proteínas e, por isso, é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. A soja, por conter um alto teor de proteínas nos grãos, possui elevada demanda por N. Estima-se que a produção de 1.000 kg de soja requer cerca de 80 kg de N, dos quais 15 kg ficam nas folhas, caules e raízes e 65 kg ficam nos grãos (HUNGRIA et al., 2005).

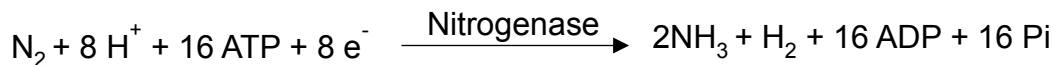
A soja pode obter N de quatro fontes diferentes. O solo constitui a primeira fonte de N, que é proveniente principalmente da decomposição da matéria orgânica. Entretanto, o N dessa fonte pode rapidamente ser esgotado após alguns cultivos, pois o reservatório de N presente na matéria orgânica é limitado. Os processos de decomposição da matéria orgânica são acelerados pelas condições de temperatura e umidade no território brasileiro, que também estimulam perdas de N em formas gasosas e por lixiviação, resultando em solos pobres deste nutriente (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A segunda fonte está na fixação não-biológica de N, que não depende de organismos vivos e resulta de processos como a reação de descargas elétricas com o N₂, a combustão e o vulcanismo. Entretanto, essas fontes possuem uma baixa contribuição de entrada de N na biosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006b; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Os fertilizantes nitrogenados representam a terceira fonte de N, com a maior facilidade de assimilação do nutriente pelas plantas. Contudo, possui custo elevado. O aproveitamento do N proveniente desses fertilizantes é baixo, pois a planta raramente consegue assimilar mais que 50% do total fornecido via fertilizante, sendo a outra metade perdida em processos de lixiviação, desnitrificação e volatilização, duplicando a quantidade de N necessária na adubação das lavouras. Além disso, a transformação industrial de N₂ em NH₃ requer: hidrogênio, catalisador contendo ferro, altas temperaturas, altas pressões e queima de petróleo. Para o Brasil, devido ao alto custo de produção e pelo fato de o país importar cerca de 70% desse insumo, o uso de fertilizantes nitrogenados para o cultivo da soja seria inviável economicamente. Destaca-se, também, o fato de que a lixiviação e o escoamento do N pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nos rios, lagos e lençóis freáticos subterrâneos. As perdas gasosas de N₂ também são prejudiciais ao meio

ambiente, visto que contribuem para a formação de falhas na camada de ozônio e para o aumento do aquecimento global (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006b; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HUNGRIA; MENDES, 2015).

A última fonte de N para as plantas é a fixação biológica do N₂ (FBN), processo realizado por algumas espécies de procaríotos. Consiste na redução do N₂ atmosférico em amônia (NH₃) pela enzima nitrogenase. A reação da nitrogenase, em condições normais de temperatura e pressão, é representada pela seguinte expressão:



(MOREIRA; SIQUEIRA, 2006b).

2.3. A IMPORTÂNCIA DA FBN PARA A CULTURA DA SOJA

Apesar de o ar atmosférico ser constituído majoritariamente por N₂, não se conhece nenhum animal ou planta que seja capaz de absorver e metabolizar esta molécula. Desse modo, esses organismos assimilam, direta ou indiretamente pela teia alimentar, N proveniente de FBN, portanto, esse processo biológico é considerado importante como mantenedor do equilíbrio ecológico, por ser essencial ao ciclo do nitrogênio (NELSON; COX, 2014).

A contribuição da FBN é particularmente importante no caso da simbiose de algumas bactérias fixadoras de N₂, coletivamente chamadas de rizóbios, com diversas espécies de plantas da família Leguminosae (=Fabaceae) (ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013).

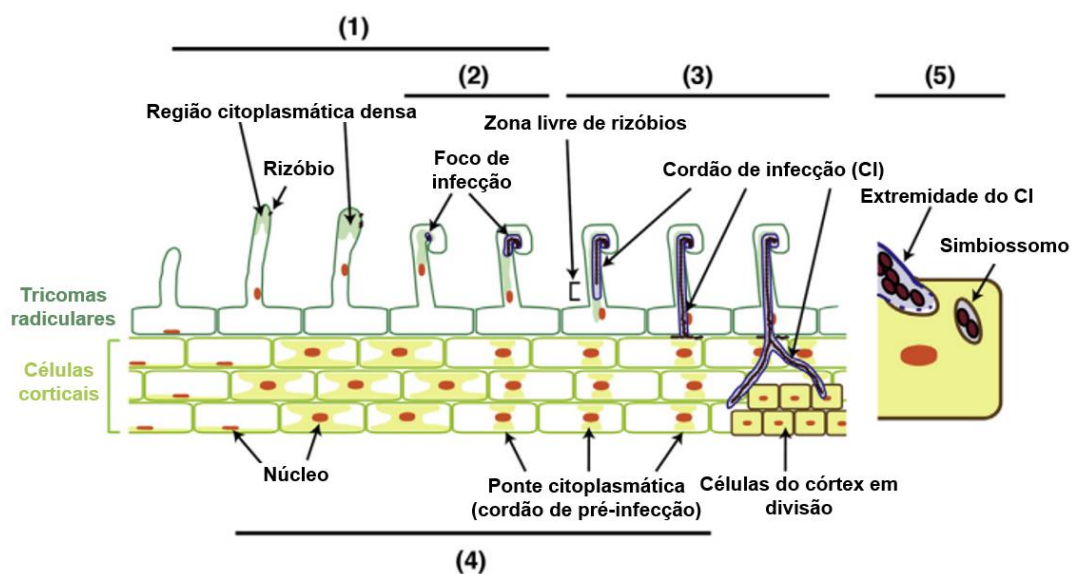
Na soja, o processo da FBN se inicia quando a semente em germinação exsuda, via radícula, moléculas que estimulam o aumento populacional de rizóbios, principalmente do gênero *Bradyrhizobium*, na rizosfera. Flavonoides produzidos e liberados no solo pela planta atraem, por quimiotaxia, as bactérias para a região da rizosfera e induzem a expressão dos genes de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*) no rizóbio (SUBRAMANIAN; STACEY; YU, 2007; THILAKARATHNA; RAIZADA, 2017).

Uma vez expressos esses genes, as bactérias sintetizam lipo-quitino-oligossacarídeos, denominados fatores de nodulação (Nod), que são exportados para a planta e induzem, concomitantemente, divisão celular no córtex da raiz e alongamento e deformação dos tricomas radiculares colonizados pelos rizóbios. Os tricomas enrolam-se aprisionando as bactérias que, em seguida, degradam a parede

celular de células do tricoma, induzindo invaginação na membrana plasmática e formando um canal que será invadido pelas bactérias, dando origem ao cordão de infecção (Figura 2) (SUZAKI; YORO; KWAGUCHI, 2015).

O cordão de infecção se desenvolve crescendo em direção à região das células em proliferação no córtex da raiz. Ao se aproximar dessa região, o cordão ramifica-se para invadir as células do córtex onde ele irá fundir-se com as membranas plasmáticas e liberar as bactérias no citoplasma dessas células para formar uma organela especializada em fixação do nitrogênio, denominada simbiossomo (Figura 2) (SUZAKI; YORO; KWAGUCHI, 2015). As bactérias no simbiossomo continuam se dividindo para então se diferenciarem em bacteroides e realizarem a FBN. A divisão celular das células corticais contendo o simbiossomo leva à formação de uma estrutura hipertrófica na raiz denominada nódulo (FERGUSON et al., 2010).

Figura 2 – Infecção e invasão do rizóbio nos tecidos radiculares de planta leguminosa para desenvolvimento dos nódulos. (1) A bactéria se adere ao tricoma radicular causando seu encurvamento induzido pelo fator Nod. (2) Degradação da parede celular e invaginação da membrana formando o cordão de infecção. (3) Alongamento do cordão de infecção. (4) Durante a infecção, forma-se uma ponte citoplasmática nas células corticais para direcionar o alongamento do cordão de infecção. (5) Quando o cordão de infecção alcança uma célula cortical a membrana do cordão colapsa com a membrana da célula liberando os rizóbios na célula para formar uma organela especializada em fixação de nitrogênio denominada simbiossomo.



Fonte: Modificado de Suzaki, Yoro e Kawaguchi (2015).

2.4. HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA FBN NO BRASIL

Os avanços científicos na primeira metade do século XIX permitiram verificar que leguminosas possuíam teores mais elevados de N em relação a espécies de outras famílias. Assim, sugeria-se que estas plantas fixavam N₂ atmosférico. Em 1886,

Hellriegel e Wilfarth comprovavam o processo de fixação do N₂ atmosférico e, em 1888, Beijerinck isolou de estruturas hipertróficas nas raízes, denominadas nódulos, as bactérias responsáveis pelo processo e as denominou *Bacillus radicola* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006a).

No Brasil, o primeiro laboratório de microbiologia agrícola foi criado em 1908 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que, em 1930, publicou relatórios com as primeiras referências sobre a simbiose rizóbio-leguminosa no país (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006a).

No início da década de 1950 dois importantes núcleos de microbiologia do solo foram criados no Brasil. O Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPAGRO) no Rio Grande do Sul e o Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas, do Ministério da Agricultura, que deu origem à Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, no Rio de Janeiro. Este último foi estabelecido pelo Dr. Álvaro Barcelos, que contratou a agrônoma Johanna Döbereiner para fazer parte de seu grupo. Dra. Döbereiner apresentou, em 1951, seu primeiro trabalho sobre microbiologia do solo, mostrando a influência da cobertura do solo sobre sua comunidade microbiana. A partir de então, a Dra. Döbereiner dedicou seus esforços em pesquisa sobre microbiologia agrícola, consagrando-se, no Brasil, como pioneira nos estudos envolvendo FBN associativa, especialmente em gramíneas (FAGUNDES; DOBEREINER, 1951; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006a; ERENO, 2008).

As primeiras tentativas de inoculação de bactérias para FBN em plantas foram realizadas na década de 1940 por José Gomes da Silva, no IAC, e por João Ruy Jardim Freire, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul (DÖBEREINER; DUQUE, 1980). Em 1950, na antiga Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA), da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, hoje Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), foi iniciada a pesquisa para a seleção de estirpes e a produção de inoculantes, um insumo agrícola à base dessas estirpes, principalmente para a soja. Foram lançadas diversas estirpes e as recomendações para utilização como inoculantes se alteraram ao longo dos anos (FREIRE; VERNETTI, 1999).

A estirpe SEMIA 587 da espécie *Bradyrhizobium elkanii* foi autorizada para a produção de inoculantes entre os anos 1968-75 juntamente com as estirpes SEMIA

543 e SEMIA 566. Em 1979 a estirpe SEMIA 587 voltou a ser recomendada como inoculante comercial para aplicação em lavouras de soja, permanecendo esta recomendação até hoje, juntamente com *B. elkanii* SEMIA 5019 (29W). A partir de 1992 passam a ser autorizadas as estirpes SEMIA 5079 (=CPAC 15) e 5080 (=CPAC 7) de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium diazoefficiens*, respectivamente, (FREIRE; VERNETTI, 1999) que, até hoje, são utilizadas em inoculantes comerciais. A estirpe SEMIA 5080 foi, por um tempo, considerada como pertencente à *B. japonicum*, mas Delamuta et al. (2013) propuseram a reclassificação dessa e outras estirpes para uma nova espécie, a qual renomearam *Bradyrhizobium diazoefficiens*. A autorização dessas estirpes consta da INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011 (MAPA, 2011).

Como a soja não é uma espécie nativa brasileira, a população de *Bradyrhizobium* spp. nativa dos solos brasileiros e compatível com a soja é baixa (FERREIRA; HUNGRIA, 2002; EMBRAPA, 2013). A estirpe SEMIA 5079, por exemplo, é uma variante natural da SEMIA 566, a qual isolada no Rio Grande do Sul em 1966 em um solo que foi inoculado um ano antes com um inoculante dos EUA. A estirpe SEMIA 5079 foi obtida em solo do Cerrado brasileiro, originalmente livre de rizóbios e que recebeu inoculante contendo a estirpe SEMIA 566. A SEMIA 5080 é uma variante natural da estirpe australiana CB 1809 e foi obtida em um programa de seleção de isolados com alta capacidade de nodulação e de aumento no rendimento de soja (HUNGRIA et al., 1996).

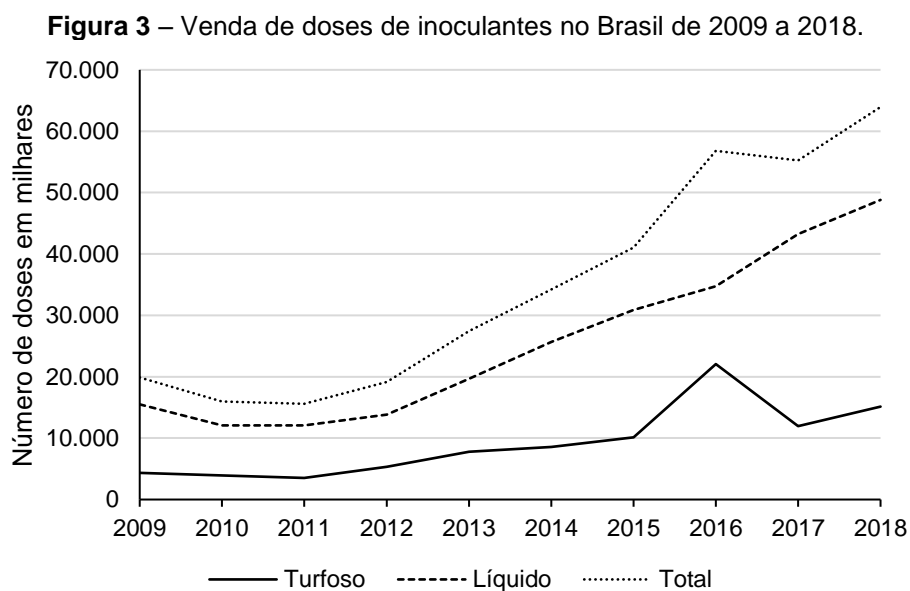
As recomendações das estirpes eram feitas de maneira informal até 1975, quando foi sancionado um decreto (Decreto nº 75.583) que exigia que os inoculantes fossem elaborados com as estirpes recomendadas pelas instituições nacionais de pesquisa (FREIRE; VERNETTI, 1999). Atualmente, encontra-se em vigor a Lei 6.894, de 16 de dezembro de 1980, aprovada via decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004 e alterada pela Lei nº 12.890, de 2013.

A produção de inoculantes no Brasil iniciou-se em 1950 na Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, com culturas líquidas e, em 1954 foi adotado, pela primeira vez no país, o veículo turfoso. O laboratório Leivas Leite, em 1956, foi o primeiro no setor privado a produzir inoculantes no Brasil e, em 1980, o país já contava com seis indústrias de produção de inoculantes, representando o segundo maior volume das vendas de inoculantes no

mundo, inferior apenas aos EUA (DÖBEREINER, DUQUE, 1980; FREIRE, 1982; FREIRE; VERNETTI, 1999).

O grande diferencial da soja no Brasil e que conferiu a ela destaque internacional, foi que o melhoramento das plantas foi realizado no sentido de aperfeiçoar a simbiose com os rizóbios, ao contrário dos EUA, onde melhoristas e microbiologistas trabalhavam de forma independente e a seleção de cultivares foi feita com aplicação de N mineral, desfavorecendo o processo biológico (DÖBEREINER, DUQUE, 1980).

Com o advento da Revolução Verde e da primeira crise energética na década de 1970, surge também a preocupação em relação à exploração dos recursos naturais não renováveis e em se estabelecer uma agricultura mais sustentável, o que também contribuiu para impulsionar o desenvolvimento de tecnologias para a produção de inoculantes no Brasil (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006a). Desta forma a cultura da soja tem sido aprimorada ao longo dos anos devido, em grande parte, à difusão das técnicas de inoculação de bactérias fixadoras de N₂. Em 2009 o número de doses de inoculantes para soja comercializados no Brasil foi de cerca de 19,9 milhões e, a partir de 2013, o país vivenciou um aumento expressivo nesse número, alcançando cerca de 63,9 milhões de doses em 2018 (Figura 3) (ANPII, [s.d.]).



Fonte: ANPII

O uso de inoculantes no Brasil proporciona uma economia atual estimada em cerca de 13 bilhões de dólares, que seriam utilizados em fertilizantes nitrogenados, por safra (HUNGRIA; NOGUEIRA, 2019). Sabe-se que as lavouras de soja possuem alta demanda de N, pois a produção de 1.000 kg de soja requer cerca de 80 kg de N, dos quais 15 kg estão nas folhas, caules e raízes e 65 kg estão nos grãos (HUNGRIA et al., 2005). Assim sendo, na safra 2018/19, estima-se que foram necessárias 9,54 milhões de t de N para a produção de 120,4 milhões de t de soja nas lavouras brasileiras. Entretanto, por se tratar de um fenômeno biológico, a otimização da FBN passa pela necessidade de se manter o ambiente em condições favoráveis às bactérias fixadoras.

Na década de 1970, Dra. Döbereiner iniciou no Brasil estudos com espécies bacterianas do gênero *Spirillum* e propôs a reclassificação do gênero para *Azospirillum*, devido à descoberta, pelo seu grupo de pesquisa, de que essas bactérias seriam capazes de fixar N₂ atmosférico (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Mais tarde esse gênero se tornou o mais estudado entre as bactérias que fazem associações com plantas. As bactérias desse gênero são de vida livre, encontradas em boa parte do globo terrestre e podem colonizar tecidos vegetais como endófitos facultativos (HUERGO et al., 2008). São conhecidas por produzir fitormônios que estimulam o crescimento das raízes, permitindo maior captação de água e nutrientes, além de atenuar os efeitos de estresses ambientais como de salinidade, seca e estresse oxidativo (BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASHAN, HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018).

As estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 são recomendadas como inoculantes comerciais no Brasil desde 2009 (HUNGRIA et al., 2010; MAPA, 2011). Inicialmente, a maior parte da aplicação dessas bactérias como inoculantes ocorreu em culturas de cereais como o trigo (*Triticum aestivum* L.) e o milho (*Zea mays* L.). Entretanto, nos últimos anos foi demonstrado que a coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* em culturas de soja aumenta o rendimento da cultura, sendo uma prática adotada comercialmente desde 2014 (HUNGRIA, NOGUEIRA, ARAUJO, 2013; HUNGRIA, NOGUEIRA, ARAUJO, 2015; HUNGRIA, NOGUEIRA, 2019; NOGUEIRA, 2019).

2.5. TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM INOCULANTES E AGROTÓXICOS

A FBN demonstra sensibilidade a fatores abióticos como disponibilidade de nutrientes no solo (macro e micronutrientes), temperatura, umidade, salinidade e pH do solo (THILAKARATHNA; RAIZADA, 2017). O aquecimento global exerce forte influência sobre estes fatores, colocando em risco a FBN (WALTHALL et al., 2012; HUNGRIA; MENDES, 2015; THILAKARATHNA; RAIZADA, 2017). Os fatores abióticos também exercem seletividade sobre as espécies de rizóbios que ocorrem em determinada região. No caso das bactérias que se associam à soja, por exemplo, em um estudo conduzido por Zhang et al. (2011) em solo alcalino da China, foi observada uma correlação positiva entre o pH do solo com a distribuição de algumas espécies de rizóbios, como *Sinorhizobium fredii* e *Bradyrhizobium yuanmingense* e uma correlação negativa com a distribuição de outras espécies, como *B. elkanii* e *B. japonicum*.

O tratamento de sementes de soja com fungicidas garante o melhor estabelecimento das plantas, evitando a introdução de espécies fúngicas transmitidas das sementes para o solo na semeadura e protegendo as sementes contra patógenos presentes no solo (EMBRAPA, 2013). Contudo, a nodulação e a FBN podem ser reduzidas devido a diferentes combinações de fungicidas utilizados no tratamento das sementes de soja (CAMPO; HUNGRIA, 2000; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009). Além disso, esse efeito é maior quando a semeadura é realizada em solos de primeiro ano de cultivo, onde há baixa ou nenhuma população de *Bradyrhizobium* spp. (FERREIRA; HUNGRIA, 2002; EMBRAPA, 2013). Como exemplo, em um experimento na região do Cerrado de Roraima em 2005, onde havia pouca disponibilidade de nutrientes e a população de *Bradyrhizobium* compatível com a soja era baixa, a presença de fungicidas em sementes inoculadas reduziu drasticamente a quantidade de nódulos formados nas raízes, quando comparada às plantas que receberam apenas inoculantes (ZILLI et al., 2009). Essa redução da nodulação também foi observada em outros estudos, tornando-se ainda mais drástica com a adição de outros agroquímicos, como inseticidas e micronutrientes. Maiores tempos de exposição a esses produtos, pela pré-inoculação, intensificam ainda mais esse efeito (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; COSTA et al., 2013), e supõe-se que ocorre pela diminuição do número de células viáveis nas sementes (CAMPO; HUNGRIA, 2000; FERREIRA et al., 2011). Além

disso, a presença dos fungicidas na rizosfera altera o padrão de exsudação das raízes, afetando os sinais moleculares envolvidos na infecção radicular pelos rizóbios (KOSSLAK et al., 1987), o que pode contribuir para a redução no número de nódulos formados nas raízes.

Os efeitos dos agrotóxicos sobre a FBN e a nodulação não ficam restritos à soja e às bactérias que fazem simbiose com essa planta. Ahemad et al. (2014) observaram reduções em diversos aspectos relacionados à FBN causadas pelo inseticida piriproxifeno em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão mungo (*Vigna radiata* L. Wiczek) e lentilha (*Lens esculentus*, = *Lens culinaris* Medik) (Tabela 1). Bactérias diazotróficas utilizadas para promoção do crescimento vegetal em plantas não leguminosas também podem sofrer efeitos dos agrotóxicos (FERNANDES et al., 2012; DASH et al., 2017).

Encontra-se, na literatura, diversos trabalhos que relatam efeitos de variados fungicidas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio que fazem simbiose com plantas de diversas espécies. A Tabela 1 apresenta resultados de alguns desses trabalhos, indicando efeitos que os agrotóxicos causaram sobre as bactérias individualmente ou quando em simbiose com a planta. É importante destacar que alguns ensaios revelam aspectos não influenciáveis pelo tratamento com os agrotóxicos. Kunal e Sharma (2011), por exemplo, não encontraram diferenças significativas entre a quantidade de N na parte aérea de plantas de grão-de-bico inoculadas com *Mesorhizobium* sp. e tratadas ou não com agrotóxico e esses tratamentos também não apresentaram diferenças na produtividade de grãos; contudo, a sobrevivência dos rizóbios em sementes foi impactada pela presença dos agrotóxicos.

Em outro estudo, Gomes, Dalchiavon e Valadão (2017) avaliaram diversas combinações entre fungicidas e inseticidas utilizados no tratamento de sementes de soja inoculadas com *B. japonicum*. Em nenhuma das combinações de agrotóxicos houve alteração no número ou massa de nódulos, N foliar e nas massas fresca e seca da parte aérea quando comparadas a um grupo não tratado com agrotóxico. Todavia, algumas combinações de agrotóxicos resultaram em redução tanto no número de vagens por planta, quanto no número de grãos por vagem.

O StandakTop™ é um defensivo agrícola de aplicação em sementes amplamente utilizado e é composto por três componentes ativos. O tiofanato-metílico é um desses componentes, sendo classificado como fungicida do grupo dos benzimidazóis. Apesar de não exercer atividade antifúngica, o tiofanato-metílico no

solo pode ser convertido ao carbendazim, que possui afinidade pela β -tubulina, uma proteína que compõe, juntamente com a α -tubulina, microtúbulos que atuam na formação de um novo núcleo celular durante a mitose (FLEEKER et al., 1974; SILVA; MELO, 1997; OLIVER; HEWITT, 2014). A ligação do carbendazim à β -tubulina resulta na falha da separação do novo núcleo, causando a morte da célula. Apesar da β -tubulina ser altamente conservada em todos os eucariotos, plantas e oomicetos são resistentes ao carbendazim (OLIVER; HEWITT, 2014). O segundo componente é a piraclostrobina é um fungicida pertencente à classe das estrobilurinas. O mecanismo de ação desse grupo de fungicidas ocorre pela inibição da respiração celular. As estrobilurinas são capazes de inibir a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e o citocromo *c* na mitocôndria, bloqueando a síntese de ATP. A baixa disponibilidade de energia ocasiona a morte celular (KANUNGO; JOSHI, 2014). Um terceiro componente do StandakTop™ é o fipronil, pertencente ao grupo pirazol, com ação inseticida. O fipronil afeta o potencial de membrana nas células dos insetos, impedindo a ligação do neurotransmissor GABA nos canais de cloro, resultando no bloqueio da entrada de íons Cl^- na célula e, conseqüentemente, excitação exacerbada do sistema nervoso (NARAHASHI, 2010; ROBEA et al. 2018).

Pesquisas a campo do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja relatam efeito negativo de agrotóxicos aplicado nas sementes de soja na sobrevivência dos rizóbios, na nodulação e no rendimento de grãos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; FERREIRA et al., 2011). Além disso, foi observado que as estirpes utilizadas em inoculantes, quando em contato com agrotóxicos utilizados no tratamento de sementes, apresentam alteração na morfologia das colônias, mais drásticas à medida que aumenta o tempo de contato das bactérias com os agrotóxicos (HUNGRIA, comunicação pessoal). Essas diferenças ainda não foram quantificadas, bem como diferenças intrínsecas que podem existir entre as estirpes de rizóbios. Também não foi verificado se as colônias que apresentam alteração voltam a apresentar morfologia normal quando não estão mais sob estresse, ou se as alterações são permanentes. Finalmente, a eficiência do processo de FBN e da nodulação em plantas inoculadas com estirpes que sofreram alteração morfológica também não foi avaliada.

Tabela 1 – Efeito de alguns agrotóxicos sobre características de diversos microrganismos diazotróficos e na interação com plantas.

Referência	Planta	Bactéria	Agrotóxico	Efeito
Cardoso et al. (2019)	Soja (<i>Glycine max</i>)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Carboxin ^f + thiram ^f , Imidacloprido ^f	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do número e massa dos nódulos • Redução na massa da parte aérea seca • Redução no número de vagens
Dash et al. (2017)	Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Cianobactérias	Benthiocarb ^h	<ul style="list-style-type: none"> • Redução da massa das bactérias secas • Redução da atividade da nitrogenase • Redução da quantidade de nitrogênio nas bactérias
			Carbofurano ⁱ	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da massa das bactérias secas • Aumento da atividade da nitrogenase • Aumento da quantidade de nitrogênio nas bactérias
Gomes, Dalchiavon e Valadão (2017)	Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Combinações em fatorial de 4 fungicidas e 4 inseticidas	<ul style="list-style-type: none"> • Redução dos números de vagens e grãos por planta • Não houve efeito sobre a nodulação e massa da parte aérea
Ahemad et al. (2014)	Grão-de-bico, ervilha, feijão, mungo e lentilha (<i>Cicer arietinum</i> , <i>Pisum sativa</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>Lens esculentus</i>)	Não especificado	Piriproxifeno ⁱ	<ul style="list-style-type: none"> • Redução das massas da planta e dos nódulos secos • Redução do número de nódulos • Redução na quantidade de N na planta • Redução na quantidade de proteínas nos grãos
Fernandes et al. (2012)	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Endosulfan ⁱ , carbofurano ⁱ	<ul style="list-style-type: none"> • Redução da D.O. na fase estacionária do crescimento celular em cultura líquida • Alteração na duração da fase lag do crescimento celular em cultura líquida
Angelini et al. (2013)	Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	Bactérias em solo de plantação	Imazetapir ^h , imazapic ^h , S-metolalchor ^h , diclosulam ^h , glifosato ^h	<ul style="list-style-type: none"> • Redução no número de UFC g⁻¹ de solo seco • Redução da atividade da nitrogenase (exceto glifosato)

Continua

Tabela 1 – Efeito de alguns agrotóxicos sobre características de diversos diazotróficos e na simbiose com plantas.

Referência	Planta	Bactéria	Agrotóxico	Efeito
Kunal e Sharma (2011)	Grão-de-bico	<i>Mesorhizobium</i> sp. (<i>Cicer</i>)	Captan ^f , chloropyrifos ⁱ , endosulfam ⁱ	<ul style="list-style-type: none"> • Redução no número de células viáveis nas sementes
Zilli et al. (2009)	Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Carbendazim ^f + thiram ^f , carboxin ^f + thiram ^f	<ul style="list-style-type: none"> • Redução na eficiência da nodulação (maior sensibilidade em <i>B. elkanii</i>)
Schulz e Thelen (2008)	Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Mefenoxam ^f + fludioxonil ^f	<ul style="list-style-type: none"> • Redução no rendimento, teor proteico e oleico dos grãos em solos de primeiro cultivo
Fox et al. (2007)	Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Metil paration ⁱ , diclorodifenilcloroetano (DDT) ⁱ , pentaclorofenol ⁱ	<ul style="list-style-type: none"> • Redução no número de nódulos • Redução da atividade da nitrogenase • Redução da massa da planta seca
Brikol; Saxena e Singh (2005)	Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Thiram ^f	<p>Até 100 µg mL⁻¹ aumento de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Número de nódulos • Massa dos nódulos secos • Atividade da nitrogenase <p>Acima de 100 µg mL⁻¹ diminuição de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Número de nódulos • Massa dos nódulos secos • Atividade da nitrogenase

^f fungicida; ^h herbicida; ⁱ inseticida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar alterações morfológicas e simbióticas relacionadas à exposição das estirpes comerciais *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 ao StandakTop™, agrotóxico composto de fungicidas e inseticida e utilizado no tratamento de sementes de soja.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar diferenças morfofisiológicas de rizóbios recuperados de sementes de soja após diferentes tempos de exposição ao StandakTop™;
- Avaliar parâmetros relacionados ao desempenho simbiótico de isolados de rizóbios recuperados de sementes de soja após exposição ao StandakTop™ nos períodos de 2 h, 7 d, 15 d e 30 d em ensaio conduzido em casa de vegetação;
- Avaliar o efeito do StandakTop™ em parâmetros simbióticos e no rendimento da soja em condições de campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARO DOS INÓCULOS PARA O TRATAMENTO DAS SEMENTES

A partir do estoque criopreservado armazenado no banco de germoplasma da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (WFCC *Collection* # 1213, WCDM *Collection* # 1054), foi feito um cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 (=CPAC 15, =CNPSO 07) e um cultivo de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 (=CNPSO 14) em placas de Petri contendo meio sólido de extrato de levedura-manitol YMA (*yeast manitol agar*, 0,5 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ NaCl; 5,0 g L⁻¹ manitol; 0,4 g L⁻¹ extrato de levedura; ágar 12,0 g L⁻¹) (VINCENT, 1970, modificado segundo HUNGRIA et al., 2016). Em seguida, as placas com os cultivos foram incubadas em posição invertida na estufa de crescimento a 28 °C por 7 dias. Após o período de incubação, em cada placa foram adicionados 5 mL de meio líquido de extrato de levedura-manitol YM com 30% de glicerol, com o auxílio de uma alça de platina, previamente flambada e a solução na placa de Petri foi homogeneizada. A seguir, 1.500 µL da suspensão foram retirados da placa de Petri e transferidos para um criotubo; para cada placa foram preparados dois criotubos para armazenamento em ultra freezer a -80°C e mantidos em um estoque criopreservado dessas bactérias para este estudo.

Para cada ensaio, foram transferidos 20 µL de cada criotubo do estoque criopreservado para 10 mL de meio de cultura YM líquido; as culturas foram então incubadas a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 7 dias. Após esse período, 500 µL das culturas foram transferidos para 50 mL de meio YM líquido e foram incubados a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 7 dias.

4.2. RECUPERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE SOJA INOCULADAS

Foram separados quatro grupos de 500 g de sementes da cultivar M5947 IPRO de soja e, em dois dos grupos, as sementes não foram tratadas com agrotóxico, enquanto nos outros dois foi aplicado 1 mL de StandakTop™ (BASF) (1 mL por 500 g de semente, conforme recomendado pelo fabricante) (piraclostrobina, 25 g L⁻¹; tiofanato metílico, 225 g L⁻¹; fipronil, 250 g L⁻¹), seguindo-se um período de secagem de 30 minutos. Foi,

então, aplicado 1 mL da cultura de *B. elkanii* estirpe SEMIA 587 ($3,06 \times 10^9$ UFC mL⁻¹) em um dos grupos contendo o agrotóxico e 1 mL da mesma cultura em um dos grupos em que não foi aplicado o agrotóxico; o mesmo procedimento foi repetido com 1 mL da cultura de *B. japonicum* estirpe SEMIA 5079 ($9,56 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Após a aplicação do agrotóxico e/ou do inoculante, as sementes foram homogeneizadas. Os tratamentos, portanto, foram definidos como: SEMIA 587; SEMIA 587 + StandakTop™; SEMIA 5079; SEMIA 5079 + StandakTop™.

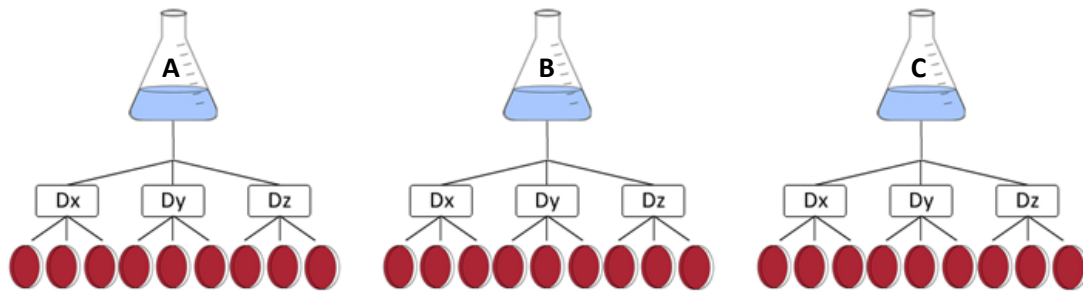
Após os períodos de 2 h, 7, 15 e 30 dias de armazenamento, foram tomadas de cada grupo, em triplicata, amostras de 100 sementes (considerando o peso médio de 100 sementes da cultivar). Essas amostras foram colocadas em frascos de Erlenmeyer estéreis com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de solução fisiológica 0,85% com o surfactante Tween 80 (0,4 mL de solução estoque de Tween 80 a 2,5% p/v por litro de solução). As triplicatas foram identificadas como repetições A, B e C. Em seguida, os Erlenmeyers foram submetidos à agitação em agitador orbital a 150 rpm por 20 minutos para lavagem das sementes. As sementes remanescentes dentro de cada grupo foram armazenadas em sacos de papel kraft a uma temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade do ar superior a 45%.

Em câmara de fluxo laminar, foram tomadas alíquotas de 1 mL da suspensão de cada Erlenmeyer e colocadas em frascos estéreis contendo 9 mL de solução fisiológica 0,85%, agitando por 20 segundos em agitador vórtex. A operação foi repetida, gerando uma diluição em série decimal. Em triplicatas, foram inoculados 100 µL de três diluições, a princípio nos fatores 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} (tempos de armazenamento maiores requereram diluições menores ou nenhuma diluição) em placas de Petri com meio YMA contendo 10% de solução de vermelho Congo a 0,25% para identificação dos rizóbios, actidione (200 µL de ciclohexamida [$84 \mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol] em 300 mL de YMA estéril) e vancomicina (100 µL de cloridrato de vancomicina [$0,3 \text{ g mL}^{-1}$] em 300 mL de YMA estéril). Esses compostos não são tóxicos aos rizóbios e diminuem a infestação pelos contaminantes das sementes. As placas foram, então, incubadas em posição invertida a 28°C por sete dias.

Portanto, para cada tratamento, houve uma triplicata na lavagem das sementes (A, B e C) com solução fisiológica 0,85% contendo Tween 80 e, para cada diluição

utilizada (três diluições de cada lavagem das sementes), outra triplicata, totalizando 27 placas por tratamento (Figura 4).

Figura 4 – Esquema do delineamento experimental para cada tratamento na recuperação das células dos rizóbios nas sementes de soja tratadas ou não com agrotóxico. A, B e C: repetições contendo 100 sementes cada. Dx, Dy e Dz: diluições.



Fonte: O autor

4.3. CONTAGEM E ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS

Após o período de incubação das placas as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas. Foram consideradas as diluições cujas médias de contagens das três placas encontraram-se na faixa entre 30 e 300 UFC e, nos casos em que uma das placas apresentou discrepância superior a 50% da média das outras duas, esta foi desconsiderada no cálculo da média. Após o cálculo da média entre as repetições das diluições, foi feito o cálculo da média geral entre as repetições A, B e C das sementes.

A média do número de UFC foi multiplicada pelo fator de diluição e pelo fator de correção 10 (correção da alíquota de 100 μL para 1 mL), determinando o número de UFC mL^{-1} . Como o volume total de solução utilizada na recuperação foi de 100 mL e o número de sementes foi equivalente ao peso médio de 100 sementes, o número de UFC mL^{-1} foi equivalente ao número de UFC semente $^{-1}$. O diâmetro médio das colônias foi estimado medindo 25% das colônias de cada placa.

4.3.1. Análise Estatística

Foram realizadas regressões com o número de UFC mL^{-1} transformado em $\log(x + 1)$ utilizando o método de SMA (*Standardized Major Axis*) (WARTON et al., 2006). Foi testada a significância ($p < 0,05$) de cada regressão e, posteriormente, foi feito o

teste de razão de probabilidade para testar a diferença entre as inclinações das retas na ausência e na presença do agrotóxico ($p < 0,05$) (WARTON; WEBER, 2002) utilizando o pacote *smatr* do programa R (versão 3.5.3, 2019) (WARTON et al., 2012).

O delineamento experimental para a contagem das colônias e diâmetro médio foi em fatorial 2 x 4 (fator 1: presença ou ausência do agrotóxico; fator 2: tempo de armazenamento das sementes). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey considerando como significativas as diferenças com valor- p inferior ou igual a 0,05. A Figura 5 mostra um fluxograma do método adotado para a preparação das amostras, a análise e a preparação para o próximo experimento.

4.4. CRIOPRESERVAÇÃO E MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS RECUPERADAS

Foram separadas aleatoriamente oito colônias por tratamento, cada colônia foi transferida para meio sólido YMA pelo método de esgotamento de colônias por estrias. Em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa de crescimento a 28°C por 7 dias. Após o período de incubação, foi realizado o procedimento de criopreservação das bactérias. Após a criopreservação das colônias (ver item 4.4), foram selecionadas três colônias criopreservadas provenientes dos tratamentos com 15 dias de armazenamento das sementes (o maior período de sobrevivência). Para cada colônia criopreservada, foram transferidos 20 µL do criotubo para 10 mL de meio de cultura YM líquido; as culturas foram então incubadas a 28°C sob agitação de 120 rpm por 7 dias e diluídas no fator de diluição 10^6 em solução fisiológica. Em placas de Petri contendo YMA contendo vermelho Congo foram espalhados 100 µL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas em posição invertida a 28°C por 7 dias. Após esse período foi mensurado o diâmetro de 25% das colônias manifestadas nas placas. Este procedimento foi adotado a fim de se esclarecer se as alterações nos diâmetros médios das colônias da exposição recente ao agrotóxico eram permanentes ou não.

4.5. ANÁLISE DE *FINGERPRINTING*

Das colônias criopreservadas, foram selecionadas, duas colônias nos tratamentos com e sem agrotóxico com armazenamento nos períodos de 2 h e 7 dias. Para o período de 15 dias foram selecionadas quatro colônias criopreservadas, totalizando, com o grupo controle que não foi isolado de sementes, 17 amostras criopreservadas para cada espécie avaliada.

Para cada ensaio, foram transferidos 20 μL de cada criotubo para frascos contendo 10 mL de meio de cultura YM líquido; os frascos foram então incubados a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 7 dias. Após esse período, foi transferido 1 mL das culturas para microtubos que foram, em seguida, centrifugados a 6.000 g por 1 minuto. As amostras foram, então, submetidas ao procedimento de extração do DNA utilizando-se o *kit* DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen), em seguida foi realizada a análise de *fingerprinting* por BOX-PCR.

A reação de amplificação dos elementos *boxA* foi realizada utilizando-se um único *primer*, o BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (KASCHUK et al., 2006). A reação foi conduzida em um volume final de 25 μL , contendo 11,95 μL de água Mili-Q estéril; 5,0 μL de dNTPs (estoque com 1,5 mmol L⁻¹ de cada base); 5,0 μL de tampão verde de reação GoTaq® 5X [1X (1,5 mM MgCl₂) (Promega)]; 1 μL de *primer* (50 pmol μl^{-1}); 1,8 μL de DNA (50 ng μL^{-1}) e 0,25 μL de GoTaq verde G2 DNA Polimerase (Promega) (5 U μL^{-1}).

As amostras foram submetidas ao termociclador (MJ Research Inc. PTC 200) com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 53°C (anelamento) e 8 min a 65°C (extensão); etapa final de extensão a 65°C por 16 min; manutenção a 10°C (HUNGRIA et al., 2008).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando-se o 1 kb *Plus Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

4.6. VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA NODULAÇÃO E FBN DAS UFC RECUPERADAS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CASA DE VEGETAÇÃO

4.6.1. Preparo do Inóculo

Foi preparado um cultivo a partir das amostras ultracongeladas, que foram recuperadas das sementes no maior tempo de exposição (15 d) em que houve um número significativo de UFC, ou seja, o período máximo em que as bactérias suportaram as condições de exposição aos agrotóxicos. A seguir, 20 µL de amostra foram transferidos para um frasco contendo 10 mL de meio líquido YM e as culturas foram incubadas a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 7 dias. Após esse período, uma alíquota de 500 µL foi transferida para um frasco contendo 50 mL de meio líquido YM, seguida por incubação a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 7 dias. Este procedimento também foi realizado com células criopreservadas que não estiveram em contato com sementes.

As culturas foram retiradas da incubação, diluídas em meio YM de forma a estabelecer a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm entre 0,300 e 0,350 (aproximadamente 4×10^8 UFC mL⁻¹). Após o ajuste da densidade óptica, as culturas que vieram de colônias de um mesmo tratamento foram misturadas, mantendo-se a mesma concentração para todas.

4.6.2. Desinfestação da superfície das Sementes

Em câmara de fluxo laminar, sementes de soja da cultivar M5947 IPRO foram embebidas em álcool a 70%, por 1 minuto e, então, retiradas do álcool e colocadas em hipoclorito a 10% por 5 minutos. Após esse período, as sementes foram, por seis vezes, lavadas em água destilada estéril. Terminado esse processo, as sementes permaneceram secas à temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar.

4.6.3. Semeadura e Inoculação

Os inóculos foram constituídos de misturas de oito colônias da estirpe SEMIA 5079 que estiveram em contato com as sementes tratadas com o agrotóxico por 15 dias; oito colônias da SEMIA 5079 que estiveram durante 15 dias em sementes não tratadas com agrotóxico; SEMIA 5079 que não foi recuperada de sementes; oito colônias da SEMIA 587 que estiveram em contato com as sementes tratadas com o agrotóxico por 15 dias; oito colônias da SEMIA 587 que estiveram

durante 15 dias em sementes não tratadas com agrotóxico; SEMIA 587 que não foi recuperada de sementes, configurando seis tratamentos. Para cada tratamento foram preparados cinco vasos de Leonard modificados (VINCENT, 1970) contendo carvão moído e areia na proporção 1:3 (v:v) e solução nutritiva isenta de nitrogênio (BROUGHTON; DILWORTH, 1971). Em cada vaso foram feitos cinco orifícios, onde foram semeadas as sementes (uma por orifício) e, em cada orifício, já com as sementes, foi transferido 1 mL de cada inóculo (4×10^8 UFC mL⁻¹). Também foram preparados cinco vasos para controle do inóculo, onde as sementes foram semeadas sem o tratamento com inoculante, contando-se, então, um total de 35 vasos de Leonard. Cinco dias após a emergência (DAE) as plantas foram desbastadas para duas por vaso.

Trinta e três DAE, foi determinado o índice SPAD, que é proporcional ao teor de clorofila nas folhas. Para a determinação do índice SPAD foi utilizado o equipamento SPAD-502 (Minolta). Em cada planta foi feita a leitura nos lados esquerdo e direito do folíolo central do terceiro trifólio, a partir do topo da planta.

A coleta foi realizada aos 35 DAE, quando a planta já atingiu o estágio R1, em que há uma flor aberta em qualquer nó da haste principal (FEHR; CAVINESS, 1977). A raiz e a parte aérea das plantas foram separadas e secas em estufa a 65 °C até atingirem massa constante, em seguida foram pesadas. A parte aérea seca foi moída (18 mesh) e o N determinado pelo método de Berthelot (SEARLE, 1984). Os nódulos foram separados das raízes, contados e novamente colocados para secagem a 65°C durante 72 h, seguindo-se a pesagem.

4.6.4. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram analisados pelo software Rbio, e os gráficos elaborados utilizando-se os softwares SigmaPlot. As médias foram comparadas pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey considerando como significativas as diferenças com valor-p menor ou igual a 0,05.

4.7. EXPERIMENTO EM CAMPO

4.7.1. Descrição dos Locais, Preparo da Área, Semeadura e Condução dos Ensaios

Foram realizados dois experimentos de campo durante a safra de 2018/19: um em Lutécia, SP (22°12'23.1"S, 50°25'59.5"O, 460 m altitude), e outro em Paranavaí, PR (22°57'29.9"S, 52°27'88.3"O, 405 m altitude). Nos dois locais, o clima é classificado como Cfa (subtropical úmido), segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, o solo é arenoso.

Antes da semeadura, foram coletadas, nos dois locais, amostras de solo (0-20 cm) para avaliar as propriedades químicas e a granulometria. A análise química foi realizada segundo Pavan et al. (1992) e Hungria et al. (2006). Após a secagem (à sombra) e peneiramento (2 mm), o pH do solo foi determinado em 0,01 M CaCl₂ (1:2,5; solo/solução), após agitação por 1 h. Os íons Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram determinados em um extrato obtido com 1 N KCl (1:10; solo/solução), após agitação por 10 min. Os teores de P e K foram avaliados em extrato de Mehlich-1 (0,05 mol L⁻¹ HCl+0,0125 mol L⁻¹ H₂SO₄) (1:10; solo/solução), após agitação por 10 min. A determinação de Al³⁺ foi realizada através da titulação em 0,015 N de solução NaOH padrão, utilizando azul de bromotimol como indicador. As concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, K em fotometria em chama e P por análise colorimétrica, utilizando o método do azul de molibdênio e ácido ascórbico como agente redutor. O carbono foi determinado pela oxidação com dicromato de potássio. Para a granulometria, as frações de areia, silte e argila foram determinadas segundo Donagema et al. (2011). A população de rizóbios no solo foi determinada pela técnica do número mais provável (VINCENT, 1970) utilizando como planta isca a cultivar de soja BRS 1010IPRO. Os dados de análise físico-química e população de rizóbios do solo podem ser visualizados na Tabela 2.

Cinquenta dias antes do início do experimento o pH do solo foi mensurado, procedendo-se a calagem para ajuste do pH para, aproximadamente, 5,5. Aos 30 dias antes da semeadura foram aplicados 1,5 L ha⁻¹ de produto comercial à base de glifosato.

As semeaduras em Paranavaí e Lutécia foram realizadas, respectivamente, em 23 e 30 de outubro de 2018. Foram aplicados 300 kg ha⁻¹ de fertilizante N-P-K (0-28-20) imediatamente antes da semeadura.

Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos ao acaso esquema fatorial 2 x 4. O primeiro fator consistiu em um grupo que recebeu 500 mL de StandakTop™ para cada 100 kg de sementes e um grupo controle que não recebeu o tratamento com o agrotóxico. Para o segundo fator, foram estabelecidos quatro tratamentos que diferiam quanto à inoculação, sendo dois controles não inoculados e dois tratamentos inoculados: (1) não inoculado (NI); (2) não inoculado com fertilizante nitrogenado (NI + N); (3) inoculado com *Bradyrhizobium* (I); (4) coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* (I + Azo).

A inoculação do *Bradyrhizobium* nos tratamentos de inoculação simples foi realizada utilizando-se o produto Total Nitro Ultra (Total Biotecnologia, Brasil) contendo uma mistura das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 (=CPAC 7, =CNPSO 06) aplicada para fornecer a concentração de $1,2 \times 10^6$ células por semente. Para a coinoculação foram acrescentadas, por semente, $1,2 \times 10^5$ células das estirpes comerciais *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, produto Azototal (Total Biotecnologia, Brasil).

Para o controle nitrogenado foram aplicados 200 kg N ha⁻¹ como ureia (46,6% de N), metade na semeadura e a outra metade quando a soja alcançou o estágio R2 [flores abertas em um dos dois nós superiores da haste principal (FEHR; CAVINESS, 1977)].

Quando a soja atingiu o estágio V4 [quatro nós na haste principal com folhas completamente desenvolvidas contando-se a partir do nó unifoliar (FEHR; CAVINESS, 1977)] foram aplicados 20 g ha⁻¹ de Mo (como Na₂MoO₄.6H₂O) e 2 g ha⁻¹ de Co (como CoCl₂.6H₂O) como pulverização foliar. Os demais tratamentos culturais foram conforme recomendados para a cultura (Embrapa, 2013).

Os ensaios foram conduzidos com delineamento experimental em blocos casualizados, com seis repetições. As parcelas foram estabelecidas com linhas espaçadas por 0,5 m e o espaçamento entre cada parcela foi de 1,5 m. A densidade das plantas foi de cerca de 300.000 plantas ha⁻¹.

Os dados mensais de pluviosidade, evapotranspiração potencial e temperaturas mínima e máxima em Lutécia e Paranaíba foram obtidos pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>) e pela

estação agrometeorológica do Instituto Agrônomo do Paraná (www.iapar.br), respectivamente (Figura 6).

Figura 6 – Dados climáticos mensais nas regiões experimentais durante o período dos ensaios. (a) Lutécia-SP, (b) Paranavaí-PR. Informação obtidas pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>) e pela estação agrometeorológica do Instituto Agrônomo do Paraná (www.iapar.br).

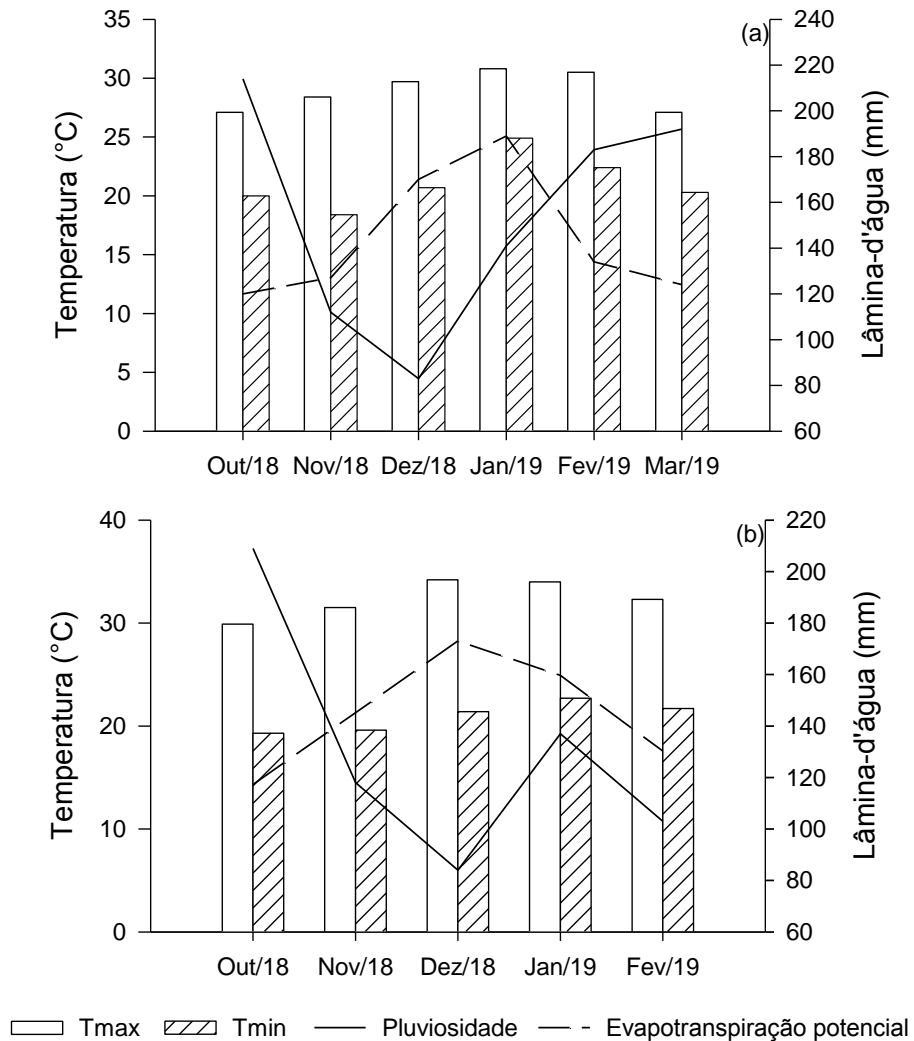


Tabela 2 – Características químicas do solo, nas camadas de 00-20 cm, antes da semeadura, nos experimentos realizados em Paranavaí-PR e Lutécia-SP, na safra 2018/2019.

Local	Prof.	pH (CaCl ₂)	P-Mehl. I	Al ³⁺	H+Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	SB	CTC	V	C	Argila	Silte	Areia	Pop. rizóbios
	cm		mg dm ⁻³				cmol _c dm ⁻³				%	g dm ⁻³		%		NMP g ⁻¹
Paranavaí	00-20	5,1	2,6	0,0	1,88	0,73	0,41	0,14	1,28	3,16	41	5,4	6,5	2,85	90,65	zero
Lutécia	00-20	5,1	2,9	0,0	1,99	0,91	0,72	0,13	1,75	3,74	47	6,3	10,30	3,10	86,60	Zero

4.7.2. Amostragens e Análises

No estádio R2 da soja, foram amostradas, aleatoriamente, seis plantas por repetição, para avaliação da nodulação (número e massa dos nódulos secos por planta), da massa da parte aérea seca e do N contido na parte aérea das plantas.

Em laboratório, as partes aéreas foram separadas das raízes, que foram lavadas, e colocadas em estufa para secagem a 65 °C até que a massa se mantivesse constante (aproximadamente 72 h). Os nódulos foram removidos das raízes, e secados novamente, para determinação da nodulação. O teor de N na parte aérea foi avaliado por digestão pelo método de Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006) em analisador modelo TOC, Flash 2000 – Organic Elemental Analyzer, Thermo Scientific e o conteúdo de N foi calculado pelo produto da concentração pela massa das plantas.

Na maturidade fisiológica, foi avaliado o rendimento de grãos (kg ha⁻¹), coletando-se uma área central de 8 m² em cada parcela. Os grãos foram lavados e a umidade dos mesmos foi ajustada para 13%. O conteúdo de N nos grãos foi avaliado pelo mesmo método e equipamento utilizado para a avaliação do teor de N na parte aérea.

4.7.3. Análise Estatística

Em algumas variáveis foi necessário aplicar a transformação dos dados pelo valor de $\sqrt{(x+1)}$ (Tabela 3). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos e as médias foram analisadas pela ANOVA seguida pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls) considerando-se significativas as diferenças com valor-*p* menor ou igual a 0,05. As médias de todas as variáveis em todos os tratamentos, exceto no não inoculado, mas com fertilização nitrogenada, foram correlacionadas entre si pela correlação de Pearson e um mapa de calor foi elaborado no software R a partir dessa correlação, também no *software* R foi realizada uma análise das componentes principais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RECUPERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE SOJA INOCULADAS

O inóculo inicial foi de $3,06 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ para *B. elkanii* estirpe SEMIA 587 e de $9,56 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para *B. japonicum* estirpe SEMIA 5079. Duas horas após a inoculação, os tratamentos apresentaram diferença no número de UFC por semente, com número menor no grupo de bactérias que estiveram em contato com o agrotóxico. Essa diferença tornou-se mais expressiva ao longo do tempo (Figura 7). Os resultados obtidos são concordantes com outros estudos conduzidos com diferentes agrotóxicos, constatando redução no número de rizóbios sobreviventes nas sementes (KUNAL; SHARMA, 2011; COSTA et al., 2013).

Embora tenha sido constatado, com as duas espécies bacterianas, independente da presença dos agrotóxicos, redução no número de UFC por semente ao longo do tempo, o efeito foi potencializado pela presença dos agrotóxicos. Isso foi confirmado pela análise de regressão dos valores obtidos com e sem agrotóxicos, onde se verifica, pelas inclinações das retas obtidas pelo método SMA, a maior taxa de mortalidade na presença do agrotóxico, para ambas as estirpes (Figura 8).

Figura 7 – Sobrevivência de (a) *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 em sementes de soja, na presença ou ausência de agrotóxico, e com diferentes tempos de armazenamento. Os dados representam médias de três repetições. As barras verticais representam o desvio padrão.

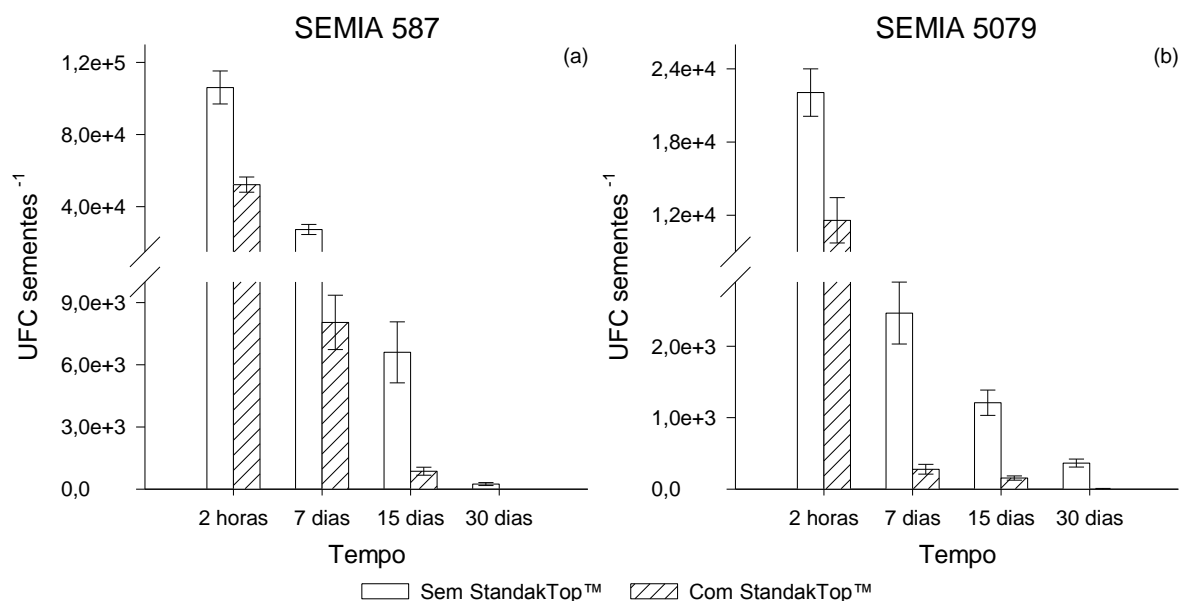
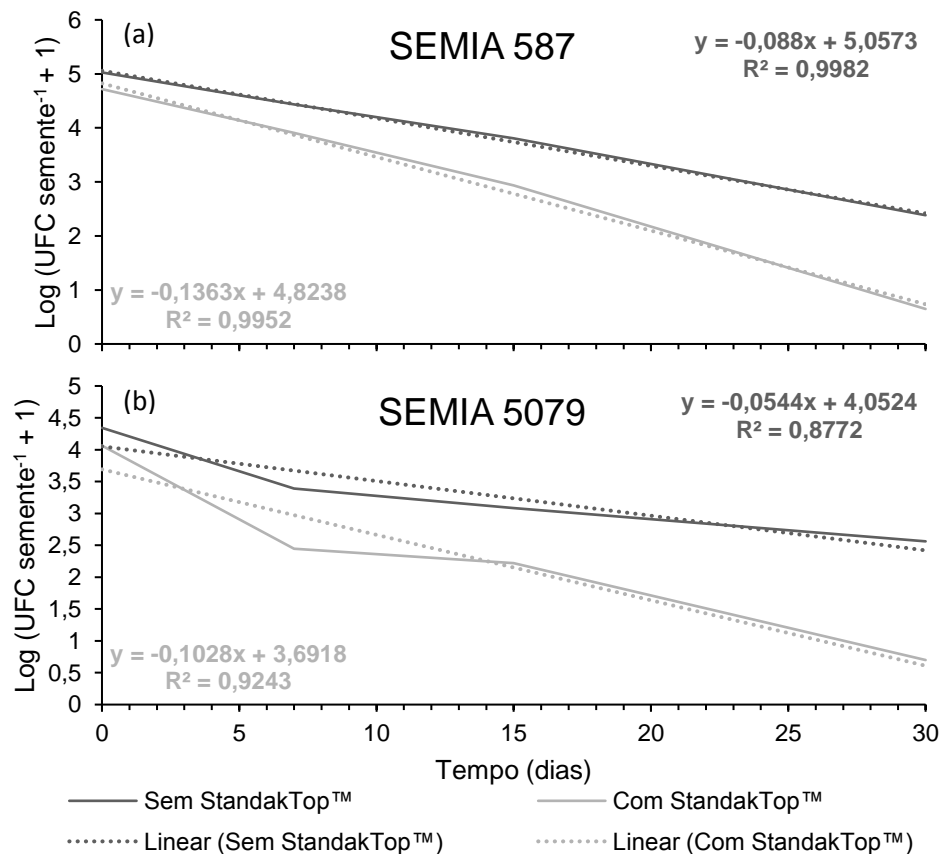


Figura 8 – Regressão linear do logaritmo de número de células de (a) *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 recuperadas de sementes de soja. Fórmulas matemáticas em cinza escuro representam as funções lineares nos tratamentos sem agrotóxico, equações em cinza claro representam funções lineares nos tratamentos com agrotóxico. Pelo teste de razão de probabilidade, houve diferença significativa entre as inclinações das retas dos tratamentos com e sem agrotóxico nas duas espécies, $p < 0,05$.



Além do impacto sobre o número de UFC recuperadas das sementes, os agrotóxicos também impactaram características morfológicas das colônias. Bactérias que estiveram em contato com os agrotóxicos manifestaram, em geral, colônias de menor tamanho (Figura 9). O tempo de armazenamento das sementes tratadas também foi um fator impactante sobre os aspectos morfológicos nos tratamentos com e sem agrotóxicos nas duas espécies de *Bradyrhizobium* avaliadas. Quanto maior o período em que as bactérias estiveram em contato com as sementes, menor foi o diâmetro médio das colônias. Contudo, a redução no diâmetro médio das colônias foi maior na presença dos agrotóxicos. *B. japonicum* mostrou menos sensível do que *B. elkanii* a alterações morfológicas aos 7 dias de armazenamento (Figura 9). Contudo, as colônias criopreservadas de ambas as retomaram o aspecto original após serem espalhadas novamente em placas de Petri (Figura 10).

Figura 9 – Diâmetro médio das colônias formadas pelas bactérias (a) *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e (b) *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5079 recuperadas de sementes de soja armazenadas durante diferentes períodos sem e com agrotóxico. Os dados representam médias de três repetições em cada tratamento.

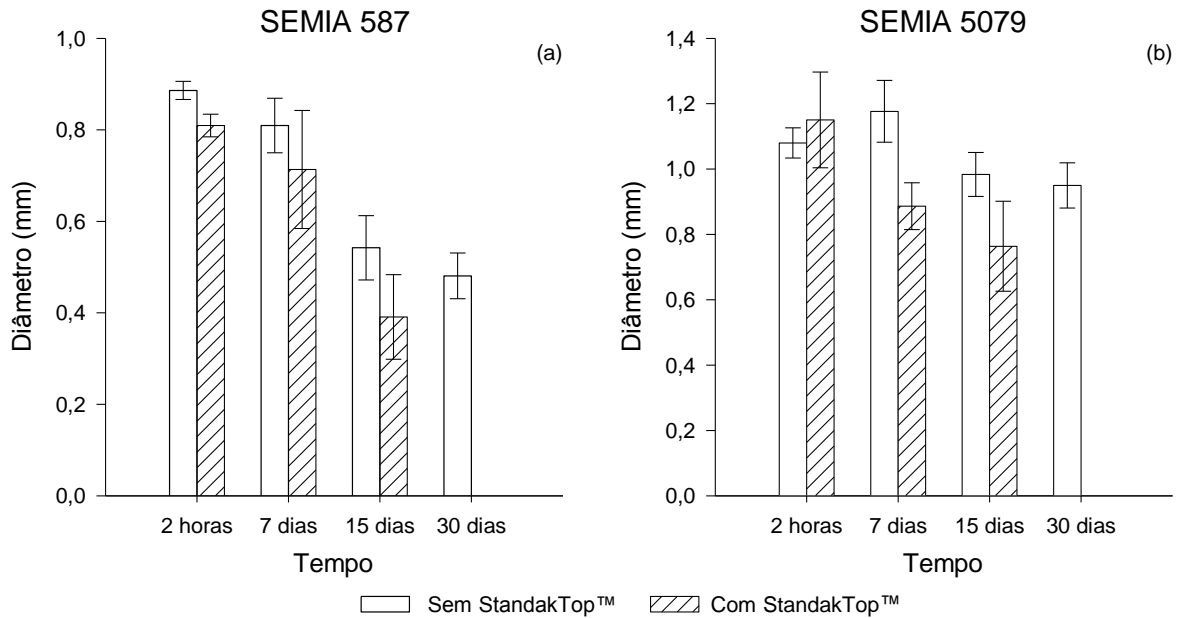
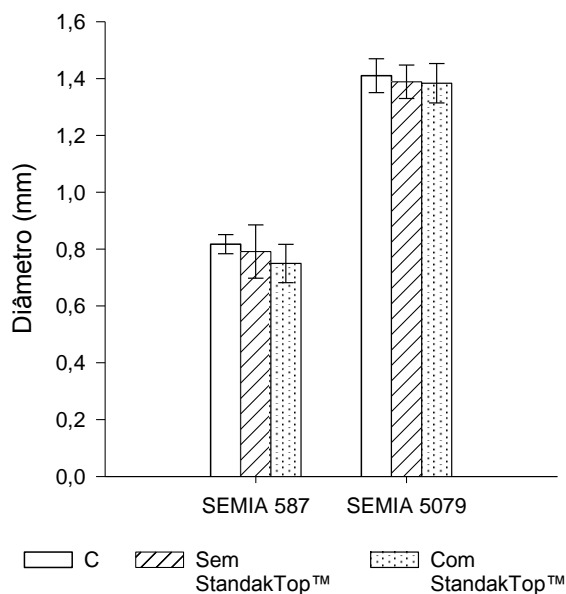


Figura 10 – Diâmetro médio de UFCs de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 provenientes de colônias isoladas e criopreservadas após os terem sido inoculadas em sementes de soja tratadas ou não com agrotóxico e armazenadas por 15 dias. As colunas vazias representam o diâmetro médio de colônias formadas por bactérias que não estiveram em contato com sementes (C: controle). As barras verticais representam o desvio padrão. Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) $n = 3$.



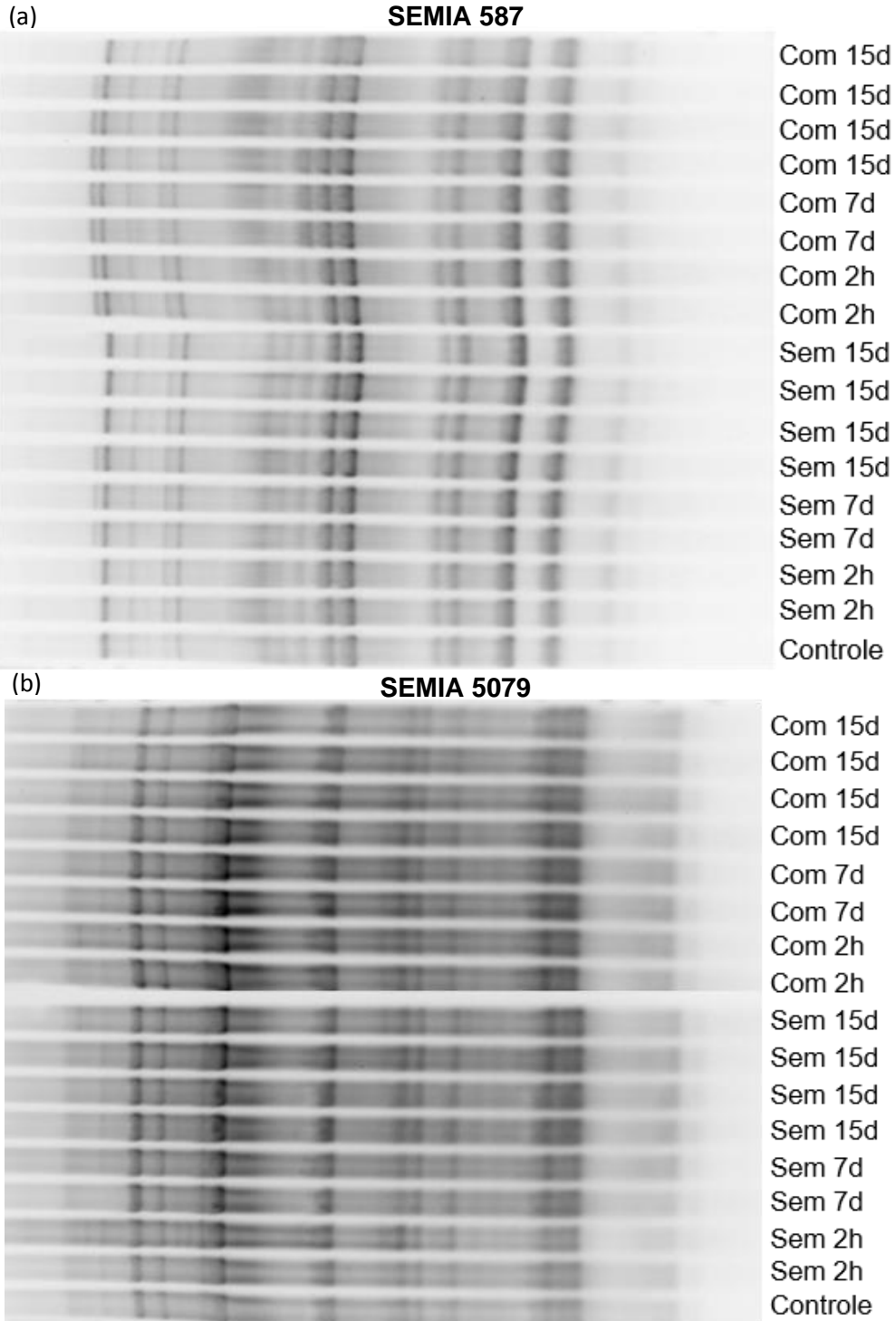
Sabe-se que quando um inóculo é feito a partir de microrganismos provenientes de uma cultura antiga ou exaurida de nutrientes, em geral haverá uma fase do crescimento celular em que a taxa de crescimento será muito baixa, pois as células

estarão exauridas de vários constituintes essenciais, requerendo esse período para sintetizá-los. A fase lag também ocorre quando o inóculo é constituído de células que sofreram algum tipo de dano decorrente de algum agente estressante, como altas ou baixas temperaturas, radiação ou compostos químicos tóxicos (MADIGAN et al., 2016). Fernandes et al. (2012) verificaram que a D.O. máxima atingida por *Herbaspirillum seropedicae* foi reduzida em cultura líquida na presença do inseticida carbofuran e sugeriram que isso esteja associado ao aumento do tempo da fase lag no crescimento dessa bactéria. Não se descarta a possibilidade de que a diminuição no tamanho das colônias de *B. japonicum* e *B. elkanii* das estirpes testadas neste estudo seja decorrente de um aumento da fase lag do crescimento celular das bactérias, visto que são oriundas de um meio escasso em nutrientes (a superfície das sementes) e à presença do agente estressante, o StandakTop™.

5.2. ANÁLISES DE *FINGERPRINTING*

As análises por BOX-PCR revelaram que, tanto em *B. elkanii* estirpe SEMIA 587 (Figura 11a), como em *B. japonicum* estirpe SEMIA 5079 (Figura 11b) não houve alteração no perfil de DNA amplificado por BOX-PCR nem pela exposição ao StandakTop™, nem pelo tempo de armazenamento, nem pela interação da exposição ao StandakTop™ e tempo de armazenamento das sementes inoculadas.

Figura 11 – Análises de *fingerprinting* por BOX-PCR de bactérias recuperadas de sementes de soja em diferentes períodos de armazenamento (2 h, 7 d, 15 d), com ou sem agrotóxico. (a) *Bradtrrhizobium elkanii* SEMIA 587 (b) *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079. Com: bactéria proveniente de sementes tratadas com StandakTop™; Sem: bactérias provenientes de sementes não tratadas com agrotóxico; Controle: Bactérias que não foram recuperadas de sementes.

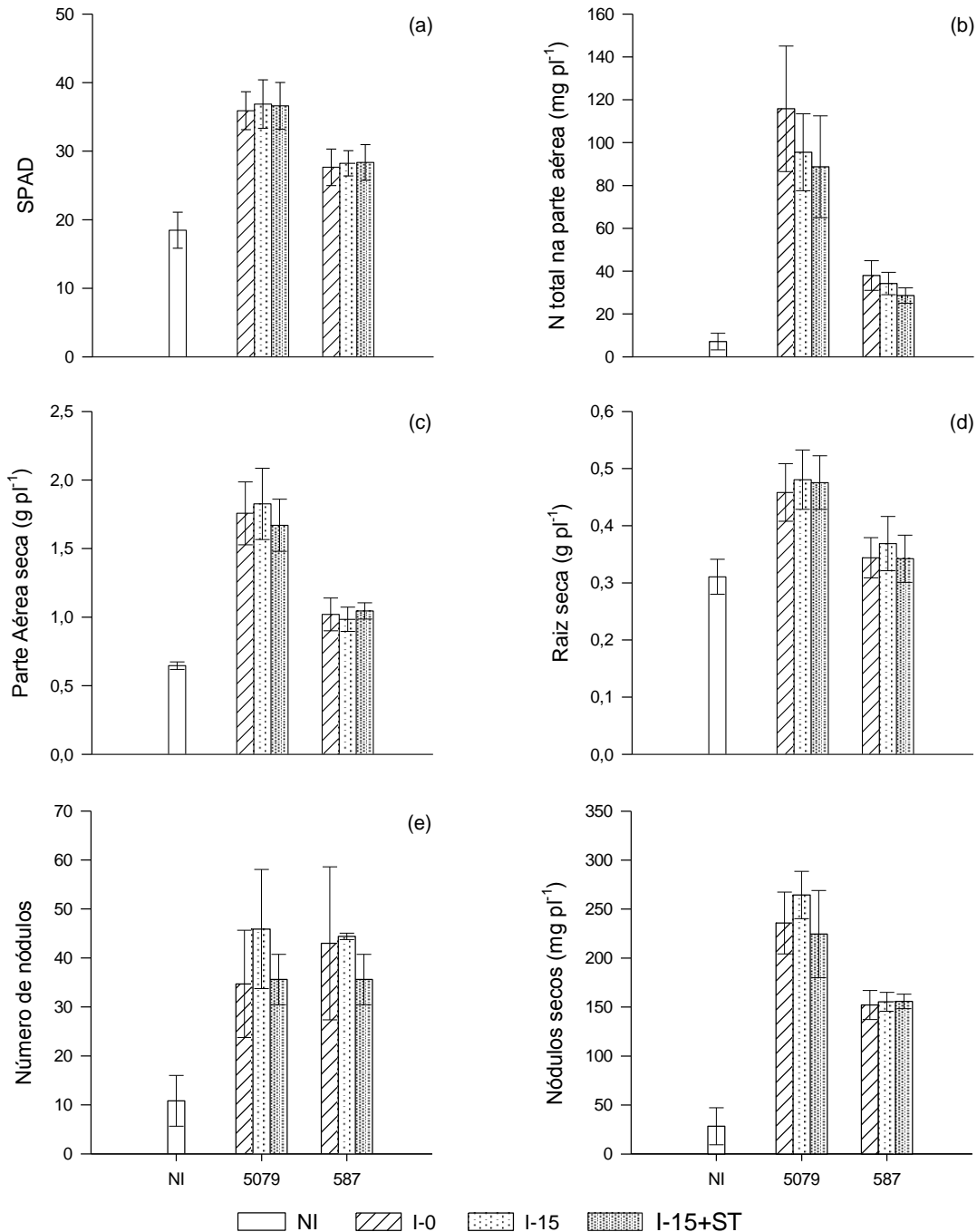


5.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O tiofanato metílico é um componente não ativo do StandakTop™, mas que pode ser transformado em carbendazim, uma molécula com atividade fungicida (FLEEKER et al., 1974). Zilli et al. (2009) mostraram que a aplicação do carbendazim + thiram reduziu a nodulação em soja inoculada com *B. japonicum* SEMIA 5079 + *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e em soja inoculada com as estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 + SEMIA 5019. Campo & Hungria (2000) observaram que as combinações de carbendazim e captam, ou thiram ou tolyfluanid, no tratamento de sementes de soja, resultaram na redução da nodulação pelas estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 combinadas.

No ensaio conduzido em casa de vegetação, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos dentro de uma mesma espécie de bactéria, em nenhum dos parâmetros avaliados, índice SPAD, N total acumulado na parte aérea, massa de raízes e da parte aérea e número e massa de nódulos, (Figura 12). Esses resultados indicam que a ação do StandakTop™ sobre estes rizóbios não altera nem seleciona bactérias com genes relacionados à nodulação e fixação de nitrogênio mutado. Sugere-se que os efeitos observados nos trabalhos citados acima ocorram quando há o contato das bactérias com o agrotóxico e não com bactérias recuperadas de um tratamento de sementes de soja com esse agrotóxico. Contudo, deve-se considerar que as condições do ensaio foram otimizadas. Portanto, não se descarta a possibilidade de haja efeitos consideráveis em condições estressantes para a planta e/ou para a bactéria, como seria o caso do campo.

Figura 12 – Atributos de plantas de soja cultivadas no experimento em casa de vegetação: (a) valor SPAD, (b) N total na parte aérea, (c) massa da parte aérea seca, (d) massa da raiz seca, (e) número de nódulos, (f) massa dos nódulos secos. No eixo das abscissas: (NI) não inoculado, (5079) inoculado com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, (587) inoculado com *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587. Legendas: (NI) controle não inoculado, (I-0) inoculado no dia da semeadura, (I-15) inoculado com bactérias recuperadas de sementes armazenadas após 15 dias de inoculação, (I-15+ST) inoculado com bactérias recuperadas de sementes tratadas com StandakTop™ e armazenadas após 15 dias de inoculação. As barras verticais indicam o desvio padrão.



5.4. ENSAIOS EM CAMPO

No experimento realizado em Paranavaí, o tratamento das sementes com agrotóxico causou efeito sobre a nodulação, aumentando o número e a massa dos nódulos secos na inoculação e somente o número de nódulos na inoculação (Tabela 3). Embora existam trabalhos demonstrando que agrotóxicos podem reduzir o número e a massa dos nódulos em soja (ZILLI et al., 2009; CARDOSO et al., 2019), há estudos que relatam não haver diferenças significativas nesses parâmetros entre tratamentos com inoculantes na presença e na ausência de agrotóxicos (BUENO; MEYER; SOUZA, 2003; GOMES; DALCHIAVON; VALADÃO, 2017). É possível que houvesse, no solo, a presença de microrganismos capazes de causar redução na nodulação e que a presença do agrotóxico tenha eliminado esses microrganismos e, conseqüentemente, seus efeitos. Pereira et al. (2010) mostraram que os inseticidas carbosulfano e imidacloprid podem reduzir a massa dos nódulos infectados por *B. elkanii* BR96 (=SEMIA 587), mas não quando infectados por *B. japonicum* BR86 (=SEMIA 5079). Esses dados contrastantes revelam a necessidade de estudos que esclareçam melhor sobre em quais condições (solo, clima, estirpe e cultivar) determinados agrotóxicos vão afetar a nodulação. Tanto na ausência como na presença do agrotóxico, o tratamento de coinoculação apresentou maior número e massa dos nódulos secos em relação ao grupo inoculado apenas com *Bradyrhizobium* spp.

Balardin et al. (2011) observaram, em um experimento em casa de vegetação, que a aplicação de uma mistura de piraclostrobina, tiofanato metílico e fipronil não resultou em diferenças na massa da parte aérea seca de soja quando comparada à planta sem aplicação desses agrotóxicos. Entretanto, em situações de déficit hídrico, a aplicação dessa mistura de agrotóxicos resultou em maior massa da parte aérea seca. Não foram encontradas informações na literatura a respeito de indução de aumento na massa da parte aérea seca, causada por esses agrotóxicos, em soja inoculada com *Bradyrhizobium* ou coinoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em situações de déficit hídrico.

No experimento realizado em Paranavaí o agrotóxico não causou efeitos sobre as massas das partes aéreas secas das plantas (Tabela 3), possivelmente devido à composição do StandakTop™ possuir os mesmos componentes testados por Balardini et al. (2011) e as condições climáticas não configuraram estresse hídrico até o

momento da amostragem (Figura 2b). Na ausência do agrotóxico, a coinoculação resultou em maior massa da parte aérea seca do que a inoculação apenas com *Bradyrhizobium*, entretanto, não houve diferença entre a inoculação padrão e a coinoculação quando a soja foi tratada com StandakTop™.

Mamenko, Khomenko e Kots (2019) demonstraram que, na presença de StandakTop™, a atividade da nitrogenase de *B. japonicum* 634b em simbiose com a soja, nos estádios V2 e V3, foi superior à das plantas sem o agrotóxico. Contudo, embora a nodulação tenha sido aumentada no experimento em Paranavaí, o teor de N nas plantas não foi aumentado. Possivelmente o efeito do StandakTop™ sobre a nitrogenase de *B. japonicum* ocorre especificamente nos estádios iniciais do desenvolvimento da soja, retomando-se à atividade normal da enzima antes que se atinja o estágio R1.

De um modo geral, os agrotóxicos não afetaram nem a concentração de N nem o N total acumulado na parte aérea, com a única exceção para um efeito negativo na concentração de N causado pelo agrotóxico no tratamento recebendo fertilizante nitrogenado (Tabela 3). Já em relação ao suprimento de N, os maiores valores sempre foram relacionados ao N-fertilizante, seguido pelo tratamento com coinoculação.

No estágio de maturidade fisiológica, em relação ao rendimento de grãos, na ausência de agrotóxicos, todos os tratamentos diferiram entre si, sendo superiores na presença do fertilizante nitrogenado, seguido pela coinoculação, inoculado apenas com *Bradyrhizobium* e controle não inoculado sem adição de fertilizante nitrogenado (Tabela 3). Hungria, Nogueira & Araújo (2013, 2015) relataram que, em determinadas condições de coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, o rendimento da cultura da soja pode ser maior do que quando se realiza a inoculação apenas com *Bradyrhizobium*. Quando na presença do agrotóxico, o rendimento tanto no controle nitrogenado, como no de coinoculação foram impactados negativamente.

Sabe-se que a piraclostrobina pode causar uma série de efeitos quando aplicada sobre diversas plantas (KANUNGO; JOSHI, 2014). Köehle et al. (2002) observaram que a assimilação de nitrato por plantas de trigo foi estimulada poucos dias após a aplicação de piraclostrobina. Além disso, esse tratamento também resultou no aumento da biomassa da planta em relação às plantas não tratadas. Nesse mesmo trabalho foi observado que a piraclostrobina pode causar alterações hormonais que retardam a senescência e que inibem a atividade da ACC-sintase e a síntese do

etileno sob condições de estresse hídrico. A piraclostrobina, em cana-de-açúcar, pode causar aumento na taxa fotossintética, atividade de enzimas antioxidantes e no número de folhas verdes, além de aumento na estatura, diâmetro do colmo e rendimento (LOPES et al, 2018). Amaro et al. (2018) observaram um aumento na atividade antioxidante em plantas de pepino japonês (*Cucumis sativus* L.) causada por esse fungicida. Junqueira et al. (2017) observaram que a aplicação de piraclostrobina com epoxiconazol não causou efeitos sobre a atividade fotossintética de milho.

Em soja, a aplicação de piraclostrobina + boscalida pode induzir a ocorrência de retenção foliar e haste verde (HILL; BOWEN; HARTMAN, 2013). É possível que estes efeitos na soja estejam relacionados à influência da piraclostrobina, observada em outras espécies, sobre a regulação hormonal e sobre a atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, esses resultados mostram que mesmo quando o agrotóxico foi aplicado nas sementes, antes da semeadura, a piraclostrobina com a boscalida podem causar efeitos a longo prazo, no estágio de maturidade fisiológica da planta.

A aplicação da piraclostrobina em soja pode resultar em incremento na produtividade de grãos e na taxa de assimilação de CO₂ nas vagens (FAGAN et al., 2007). Contrastando com esta informação, o rendimento foi afetado negativamente pela presença do agrotóxico nos tratamentos de fertilização nitrogenada e de coinoculação, além disso, não foram observados efeitos da presença do agrotóxico sobre o rendimento nos demais tratamentos. Essa diferença nos resultados pode ter ocorrido em função da aplicação do StandakTop™ ter sido realizada em um momento diferente do realizado por Fagan et al. (2010), cujo objetivo era estudar os efeitos fisiológicos pela aplicação nos estádios R1 e R5.1 da soja.

Durante o preenchimento dos grãos, N é remobilizado das folhas (SINCLAIR; WIT, 1976; MASTRODOMENICO; PURCELL, 2012), resultando em diminuição no teor de clorofila e amarelamento das folhas. A presença do agrotóxico impactou negativamente o acúmulo de N nos grãos em Paranaíba (kg N ha⁻¹) em todos os tratamentos (Tabela 3). Como a piraclostrobina, quando aplicada em sementes, pode causar retenção foliar e haste verde em soja e retardo na senescência, comprovada em trigo (KÖEHLE et al., 2002; HILL; BOWEN; HARTMAN, 2013), uma hipótese é que a aplicação de piraclostrobina possivelmente de alguma forma cause efeitos sobre a remobilização do N das folhas para os grãos.

Outra hipótese a respeito da redução do rendimento e N total nos grãos está nos efeitos, já relatados, de um derivado do tiofanato metílico presente no StandakTop™, o carbendazim, sobre essas variáveis em soja. Campo & Hungria (2000) verificaram o efeito das combinações carbendazim + thiram, carbendazim + captan e carbendazim + tolyfluianoid e observaram redução no rendimento, na primeira dessas combinações, e redução do N total dos grãos na terceira. Além dessas, também foram testadas outras quatro combinações de agrotóxicos com thiram e, em nenhuma delas, houve redução no rendimento dos grãos. Todas essas combinações foram realizadas concomitante ao tratamento das sementes com as estirpes SEMIA 5079 e 5080. Campo & Hungria (2000) observaram que essas mesmas combinações de carbendazim não reduziram o rendimento dos grãos, mas causaram redução do teor de N nos grãos.

Zilli et al. (2009) constataram, em um experimento de campo, que a aplicação de carbendazim + thiram reduziu a massa dos nódulos secos, rendimento de grãos e teor de N nos grãos em plantas inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, embora tenham sido testadas as estirpes SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, nestas não houve efeitos sobre o rendimento ou teor de N nos grãos. Schulz e Thelen (2008) mostraram que a aplicação de uma combinação dos fungicidas mefenoxam e fludioxonil em culturas de soja inoculadas com *B. japonicum* em solos de primeiro cultivo reduziu o conteúdo proteico nos grãos.

Sabe-se que o N compõe ácidos nucleicos e aminoácidos, e que os teores de proteína no grão da soja desempenham um papel econômico relevante para a produção desta leguminosa. Considera-se que a proteína na soja seja equivalente, em qualidade, à proteína animal e superior à de outras plantas utilizadas como fontes de proteína (UNCTAD, 2016). O menor acúmulo de N nos grãos nas lavouras pode causar impactos em uma extensa cadeia produtiva devido à diversidade de produtos existentes que foram desenvolvidos com base no teor proteico do grão. Na pecuária, por exemplo, utiliza-se da soja processada como fonte de proteína para alimentação animal (UNCTAD, 2016). Como o efeito do agrotóxico sobre o teor de N nos grãos persistiu em todos os tratamentos tratados com StandakTop™, é importante que esforços sejam concentrados para que novas técnicas sejam desenvolvidas com a finalidade de corrigir esse déficit.

No ensaio realizado em Lutécia, a nodulação não foi afetada pela presença do agrotóxico em nenhum dos tratamentos (Tabela 3). Contudo, a presença do agrotóxico causou redução da massa da parte aérea seca em todos os tratamentos, diferindo dos efeitos observados em Paranaíba, onde não ocorreu esta redução. É possível que as plantas tenham sofrido efeito pelas condições de déficit hídrico neste local (Figura 2) corroborando com os resultados apresentados por Balardini et al. (2011) onde o agrotóxico causou diferenças nas massas das partes aéreas secas somente quando houve ocorrência de déficit hídrico.

Os resultados também divergiram nos valores de N total acumulado na parte aérea, pois em Lutécia o agrotóxico não causou efeitos nesse parâmetro em quaisquer tratamentos. Entretanto, a concentração do N no tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* na presença do agrotóxico foi maior que na ausência (Tabela 3).

Em relação ao rendimento de grãos na maturidade fisiológica, em Lutécia, a inoculação, coinoculação e a adição de N-fertilizante resultaram em incrementos em relação ao controle não inoculado e sem N-fertilizante, mas nenhum dos tratamentos foi afetado pela presença do agrotóxico (Tabela 3). Contudo, assim como havia sido constatado em Paranaíba, em todos os tratamentos não inoculados, inoculados, ou recebendo N-mineral, o N total dos grãos foi impactado negativamente pela presença do agrotóxico. Desse modo, pode-se concluir que o agrotóxico afetou negativamente, nos dois locais, o metabolismo do N. O efeito pode ter sido via fixação biológica do nitrogênio ou via assimilação de N mineral, ou via mecanismos de mobilização do N da parte aérea para os grãos.

Tabela 3 – Médias das variáveis analisadas nos experimentos em Paranavaí-PR e Lutécia-SP, na safra 2018/2019.

		Paranavaí							Lutécia						
		NN n° pl ⁻¹	MN mg pl ⁻¹	MPA g pl ⁻¹	cN mg g ⁻¹	NTPA Mg pl ⁻¹	R kg ha ⁻¹	NG kg N ha ⁻¹	NN n° pl ⁻¹	MN mg pl ⁻¹	MPA g pl ⁻¹	cN mg g ⁻¹	NTPA mg pl ⁻¹	R kg ha ⁻¹	NG kg N ha ⁻¹
Sem StandakTop™	NI	0,0 Ac	0,00 Ac	2,7 Ac	17,5 Ac	47,4 Ac	1021,8 Ad	53,2 Ad	0,2 Ab	2,1 Ab	6,0 Aa	19,6 Aa	117,5 Aa	2319,6 Ab	133,7 Ac
	NI + N	0,0 Ac	0,00 Ac	5,4 Aa	29,8 Aa	162,0 Aa	2659,0 Aa	157,0 Aa	0,8 Ab	0,3 Ab	7,5 Aa	22,2 Aa	165,3 Aa	3128,0 Aa	176,0 Aab
	I	2,6 Bb	17,40 Bb	2,5 Ac	21,2 Abc	52,4 Ac	1532,7 Ac	88,3 Ac	10,9 Aa	81,9 Aa	5,1 Aa	19,2 Ba	98,6 Aa	2728,6 Aa	153,9 Ab
	I +Azo	9,3 Ba	97,80 Aa	3,5 Ab	24,8 Ab	87,6 Ab	2052,0 Ab	127,0 Ab	14,9 Aa	100,2 Aa	5,0 Aa	22,4 Aa	111,9 Aa	3026,4 Aa	176,3 Aa
Com StandakTop™	NI	0,0 Ac	1,00 Ac	2,0 Ac	21,4 Aa	40,5 Ad	815,7 Ab	24,5 Bd	0,1 Ab	1,5 Ab	5,2 Ba	21,8 Aa	112,8 Aa	2156,0 Ab	80,3 Bc
	NI + N	0,3 Ac	1,10 Ac	6,0 Aa	23,1 Ba	138,2 Aa	1607,0 Ba	101,3 Ba	0,1 Ab	0,8 Ab	5,3 Ba	20,7 Aa	108,8 Aa	2769,0 Aa	126,5 Bab
	I	6,3 Ab	64,2 Ab	3,3 Ab	22,6 Aa	74,6 Ac	1442,8 Aa	59,0 Bc	11,8 Aa	69,2 Aa	4,3 Ba	23,5 Aa	101,3 Aa	2845,8 Aa	120,8 Bb
	I +Azo	12,0 Aa	118,3 Aa	3,5 Ab	25,1 Aa	83,1 Ab	1550,8 Ba	70,0 Bb	17,5 Aa	84,3 Aa	5,4 Ba	20,1 Aa	108,4 Aa	2863,6 Aa	134,4 Ba
C.V. (%)		28,22*	26,79*	20,25	17,24	11,5*	19,63	22,04	37,51*	38,87*	12,06*	14,41	15,7*	10,18	14,08

NN: número de nódulos, MN: massa dos nódulos, MPA: massa da parte aérea seca, NPA: teor de N na parte aérea, cN: Concentração de N na parte aérea, R: Rendimento, NG: total de N nos grãos.

* C.V. dos valores transformados em $\sqrt{(x+1)}$

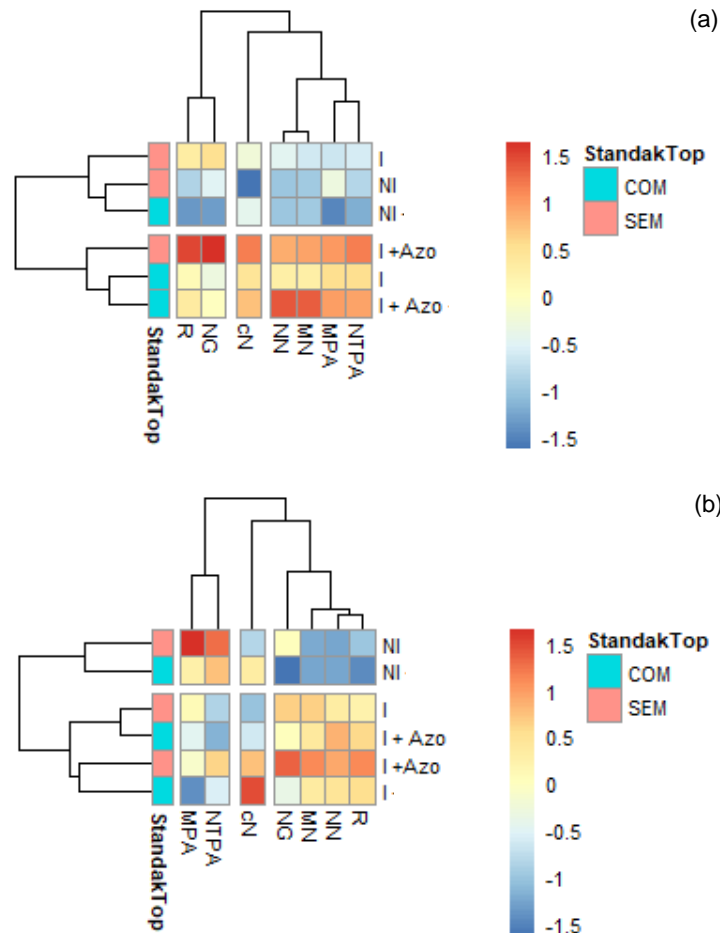
Letras maiúsculas representam comparações dentro de uma mesma forma de suprimento de N pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Letras minúsculas representam comparações dentro de um mesmo tratamento de ausência ou presença do agrotóxico pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Um mapa de calor é uma representação gráfica dos dados, onde os valores são representados por uma escala de cor numa matriz, que representa o nível de correlação entre uma variável e um tratamento. Variáveis e tratamentos podem ser agrupados de acordo com as semelhanças no padrão de correlações entre eles. Pelos mapas de calor observa-se que, em Paranavaí (Figura 13a), os tratamentos com e sem agrotóxico no grupo inoculado apenas com *Bradyrhizobium* foram alocados em clados de baixa similaridade. Na ausência do agrotóxico o tratamento foi agrupado aos controles não inoculados, onde houve, em geral, correlações negativas com as variáveis. Entretanto, a presença do agrotóxico resultou no agrupamento da inoculação simples junto com os tratamentos de coinoculação, em que ocorreram correlações positivas com as variáveis. Além disso, verifica-se que, os parâmetros de nodulação mantiveram-se próximos, isto porque, um maior número de nódulos num tratamento, possivelmente será acompanhado de aumento na massa desses nódulos. Verifica-se, também, que os parâmetros de nodulação possivelmente possuem maior relação com a massa da parte aérea seca e N total na parte aérea do que com o rendimento e com o teor de N nos grãos.

Em Lutécia, o mapa de calor (Figura 13b), entretanto, exibiu um padrão de correlação diferente do observado em Paranavaí. A inoculação apenas com *Bradyrhizobium* e sem agrotóxico exibiu menor similaridade com os controles, apesar de ainda ter sido alocada em uma posição distanciada do tratamento de inoculação apenas com *Bradyrhizobium* na presença do agrotóxico. Ainda contrastando com os resultados obtidos no experimento realizado em Paranavaí, a nodulação apresentou maior relação com o rendimento e N nos grãos do que com a massa da parte aérea seca e nitrogênio total na parte aérea.

Figura 13 – Mapas de calor correlacionando as variáveis e tratamentos obtidos nos experimentos em (a) Paranavaí-PR e (b) Lutécia-SP, na safra 2018/2019. As linhas agrupam tratamentos e colunas agrupam variáveis. NI: não inoculado, I: inoculado com *Bradyrhizobium*, I + Azo: coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. NN: número de nódulos, MN: massa dos nódulos, MPA: massa da parte aérea seca, cN: concentração de N na parte aérea, NTPA: N total na parte aérea, R: Rendimento, NG: nitrogênio nos grãos.



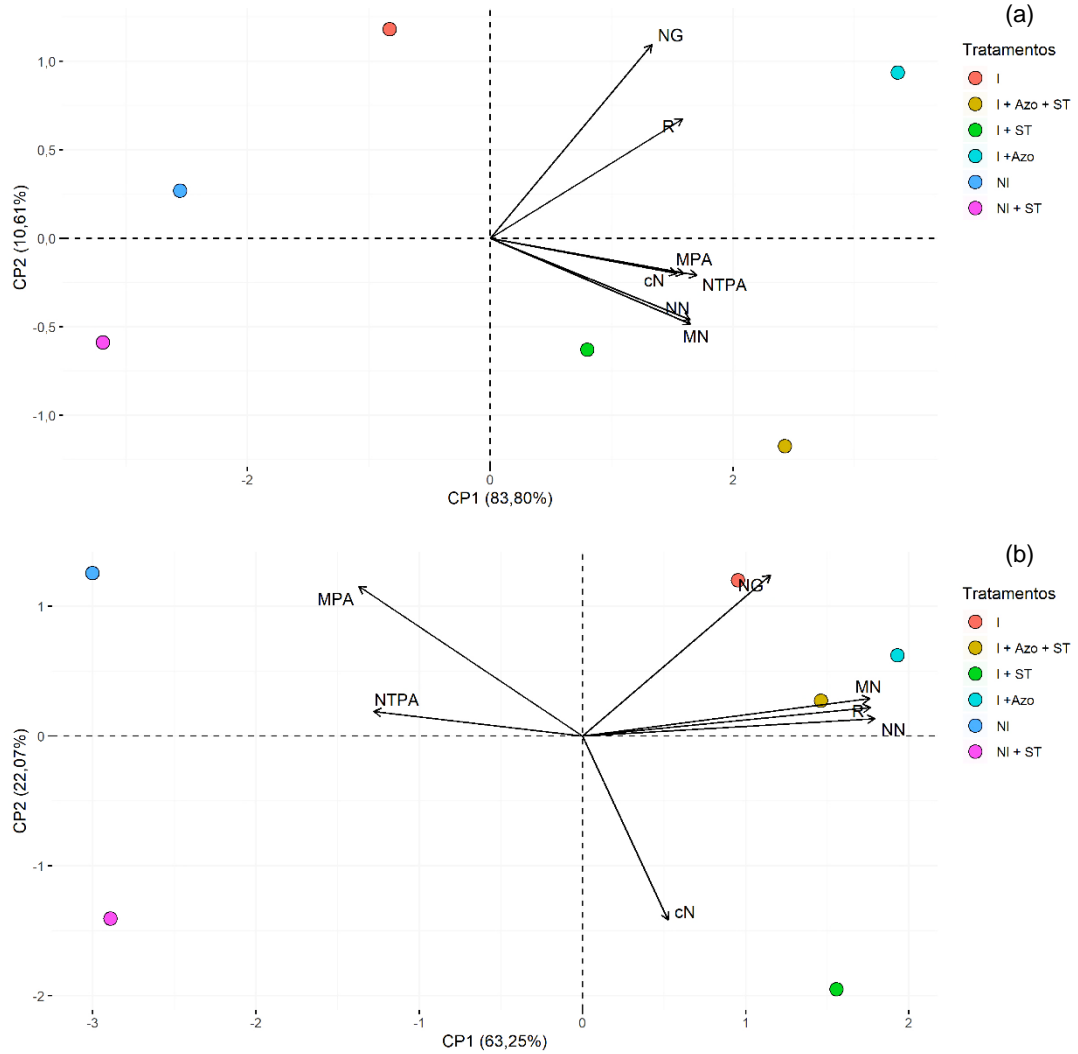
Esses resultados podem ser confirmados pela análise das componentes principais (ACP) representadas na Figura 14. Em Paranavaí, verifica-se correlação positiva entre as variáveis massa dos nódulos secos, número de nódulos, massa da parte aérea seca, concentração de N e N total na parte aérea com os tratamentos de inoculação simples e de coinoculação, ambos na presença do agrotóxico. O único tratamento que exibiu correlação positiva com R e NG foi o de coinoculação sem agrotóxico. Analisando apenas a componente principal 1, todos os tratamentos sem o agrotóxico estiveram correlacionados positivamente com as variáveis NG e R enquanto a presença do agrotóxico causou correlação negativa com essas variáveis.

Em Lutécia, houve correlação positiva entre a inoculação apenas com *Bradyrhizobium* e o teor de N nos grãos. O rendimento, a massa e o número de

nódulos mantiveram-se correlacionados positivamente com os tratamentos de coinoculação tanto na ausência como na presença do agrotóxico.

De um modo geral, nos dois sítios experimentais, houve correlação positiva entre a nodulação e a coinoculação na presença do agrotóxico, a concentração de N foi correlacionada positivamente com a inoculação apenas com *Bradyrhizobium* com agrotóxico e correlação negativa com o grupo não inoculado na ausência do agrotóxico. O grupo não inoculado e tratado com o agrotóxico não exibiu correlação positiva com quaisquer variáveis.

Figura 14 – Análise das componentes principais que descrevem os resultados dos experimentos realizados em (a) Paranavaí-PR e (b) Lutécia-SP, na safra 2018/2019. NI: não inoculado, I: inoculado com *Bradyrhizobium*, I + Azo: coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. NN: número de nódulos, MN: massa dos nódulos, MPA: massa da parte aérea seca, cN: concentração de N na parte aérea, NTPA: N total na parte aérea, R: Rendimento, NG: nitrogênio nos grãos; + ST: tratado com StandakTop™.



6. CONCLUSÕES

- O tratamento combinado de sementes de soja com StandakTop™ e inoculantes contendo *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 ou *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 reduziu o número de células viáveis aderidas às sementes em relação às sementes não tratadas com o agrotóxico, sendo o efeito ainda mais drástico com o tempo armazenamento, com inexpressivo número de células viáveis remanescentes aos 30 dias;
- O tratamento com StandakTop™ resultou em alterações morfológicas nas estirpes SEMIA 587 de *B. elkanii* e SEMIA 5079 de *B. japonicum*, com diminuição no diâmetro de colônias de células recuperadas de sementes; contudo, o efeito é reversível, tanto na morfologia, como na eficiência da fixação biológica do nitrogênio;
- O contato de StandakTop™ por até 15 dias não resultou em alterações nos perfis de DNA amplificados por BOX-PCR das estirpes SEMIA 587 de *B. elkanii* e SEMIA 5079 de *B. japonicum*;
- O tratamento com StandakTop™ não resultou em diferenças na eficiência da nodulação e outros parâmetros da simbiose em ensaio conduzido em de casa de vegetação;
- A campo, o tratamento com StandakTop™ não afetou parâmetros simbióticos no estágio vegetativo; contudo, na maturidade fisiológica, o agrotóxico reduziu significativamente o rendimento de grãos em Paranavaí nos tratamentos recebendo N-mineral ou coinoculado com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* e, principalmente, o N total nos grãos, nos dois locais, em todos os tratamentos, inoculados ou recebendo N-mineral, indicando um impacto negativo no metabolismo do N e/ou na remobilização do N nas plantas.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M. Growth suppression of legumes in pyriproxyfen stressed soils: A comparative study. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 1, p. 66-72, 2014. (DOI: 10.9755/ejfa.v26i2.15463).
- ANGELINI, J. et al. The effects of pesticides on bacterial nitrogen fixers in peanut-growing area. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 683-692, 2013. (DOI: 10.1007/s00203-013-0919-1).
- ANPII (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes). **ESTATÍSTICAS**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 16 nov. 2019.
- AMARO, A. C. E. et al. Effects of the fungicides azoxystrobin, pyraclostrobin and boscalid on the physiology of Japanese cucumber. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 66-75, 2018. (DOI: 10.1016/j.scienta.2017.10.016).
- BALARDIN, R. S. et al. Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como redutores dos efeitos do estresse hídrico em plantas de soja. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1120-1126, 2011. (DOI: 10.1590/s0103-84782011000700002).
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997. (DOI: 10.1139/m97-015).
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G., DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004. (DOI: 10.1139/w04-035).
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: Embrapa Soja, 1987. 61 p. (Embrapa Soja. Documentos, 21). (ISSN 0101-5494).
- BRIKOL, 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. (DOI: 10.5897/ajb2005.000-3122).
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J.; Control of leghemoglobin in snake beans. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 1075-1080, 1971. (DOI: 10.1042/bj1251075).
- BUENO, C. J.; MEYER, M. C.; SOUZA, N. L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 231-235, 2003. (DOI: 10.4025/actasciagron.v25i1.2676).
- CARDOSO, M. B. et al. Associação da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* com agrotóxicos utilizados no tratamento de sementes de soja. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18526-18537, 2019. (DOI: 10.34117/bjdv5n10-105).
- CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 31 p. (Embrapa Soja. Boletim de pesquisa, 4). (ISSN 1516-7860).
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and

bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, n. 1–3, p. 154–163, 2009. (DOI: 10.1007/bf03179994).

CONAB. **Séries históricas**: soja. Disponível em: <https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safras/safra-serie-historica>. Acesso em: 29 out. 2019.

COSTA, M. R. et al. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 25, p. 186–192, 2013. (DOI: 10.1590/s0100-54052013000300007).

DASH, N. P. et al. Agrochemicals influencing nitrogenase, biomass of N₂-fixing cyanobacteria and yield of rice in wetland cultivation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 28-34, 2017. (DOI: 10.1016/j.bcab.2016.11.001).

DELAMUTA, J. R. M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342–3351, 2013. (DOI: 10.1099/ijs.0.049130-0).

DÖBEREINER, J. DUQUE, F. F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 18, n. 3, p.447-460, 1980.

DONAGEMA, G. K.; CAMPOS, D. V. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. H. M. (Orgs). **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230 p. (Embrapa Solos. Documentos, 132). (ISSN 1517-2627).

D'UTRA, G. Soja. **Jornal do Agricultor**, v. 4, n. 7, p. 185-188, 1882.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Tecnologias de produção de soja**: região Central do Brasil - 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16). (ISSN 2176-2902).

ERENO, D. Adubo biológico. **Pesquisa FAPESP**, v. 148, p. 48-47, 2008.

FAGAN, E. B. et al. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 771-777, 2010. (DOI: 10.1590/s0006-87052010000400001).

FAGUNDES, A. B., DÖBEREINER, J. Influência da cobertura do solo sobre sua flora microbiana. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 3., Recife, 1951, **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1951. p. 307-311. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=597301&biblioteca=vazio&busca=597301&qFacets=597301&sort=&pagina=1&paginaAtual=1>. Acesso em: 14 nov. 2019.

FEHR, W. R., CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Special Report n. 87, 1977. Ames: Iowa State University, 1977, Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>. Acesso em: 29 out. 2019. FERGUSON, B. J. et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation.

Journal of Integrative Plant Biology. v. 52, n. 1, p. 61–76, 2010. (DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x).

FERNANDES, M. F. et al. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 318-326, 2012. (DOI: 10.4322/rca.2012.077).

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p. 139-152, 2002. (DOI: 10.1016/s0378-4290(02)00119-3).

FERREIRA, E. et al. Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA NA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., São Pedro, 2011. **Resumos expandidos....** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 325-327. (ISBN 978-85-7033-021-5).

FLEEKER, J. R. et al. Persistence and metabolism of thiophanate-methyl in soil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 22, n. 4, p. 592-595, 1974. (DOI: 10.1021/jf60194a046).

FOX, J. E. et al. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 24, p. 10282-10287, 2007. (DOI: 10.1073/pnas.0611710104).

FREIRE, J. R. J. Research into the *Rhizobium*/Leguminosae symbiosis in Latin America. **Plant and Soil**, v. 67, p. 227-239, 1982. (DOI: 10.1007/bf02182770).

FREIRE, J. R. J. A., VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.

FUKAMI, J., CEREZINI, P., HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 73, 2018. (DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1).

GALVANI, F., GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2006. 9 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica 63). (ISSN 1517-1965).

GOMES, Y. C. B.; DALCHIAVON, F. C.; VALADÃO, F. C. A. Joint use of fungicides, insecticides and inoculants in the treatment of soybean seeds. **Revista Ceres**, v. 64, n.3, p. 258-265, 2017. (DOI: 10.1590/0034-737x201764030006).

HILL, C. B., BOWEN, C. R., HARTMAN, G. L. Effect of fungicide application and cultivar on soybean green stem disorder. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1212-1220, 2013. (DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1191-RE).

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D., SALAMONE I., G. (Eds.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. 1ª ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p. 17–36.

- HUNGRIA, M. et al. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N₂ fixation rates. **Plant and Soil**, v. 186, p. 331-341, 1996. (DOI: 10.1007/bf00014767).
- HUNGRIA, M. et al. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Dordrecht, Amsteram: Springer, 2005. p. 25–42.
- HUNGRIA, M. et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006. (DOI: 10.4141/p05-098).
- HUNGRIA, M. et al. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79). (ISSN 1516-1752).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X).
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010. (DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0).
- HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A., ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013. (DOI: 10.1007/s00374-012-0771-5).
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUJIN, F. J. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. v.2. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1009-1023. (DOI: 10.1002/9781119053095.ch99).
- HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A., ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015. (DOI: 10.4236/ajps.2015.66087).
- HUNGRIA, M. et al. Isolation and growth of rhizobia. In: HOWIESON, J.G.; DILWORTH, M.J. (Eds.). **Working with rhizobia**. Chapter 3. Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR): Canberra, Australia, 2016. p. 39-60.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Mitos, verdades e desafios. In: **Boletim de Pesquisa 2019/2020**. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19).
- HYMOWITZ, T. The history of the soybean. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Eds.). **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008. p. 1–31. (DOI: 10.1016/B978-1-893997-64-6.50004-4)

- JUNQUEIRA, V. B. et al. Pollen viability, physiology, and production of maize plants exposed to pyraclostrobin + epoxiconazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 137, p. 42-48, 2017. (DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.09.007)
- KANUNGO M.; JOSHI, J. Impact of pyraclostrobin (F-500) on crop plants. **Plant Science Today**. v. 1, n. 3, p. 174-178, 2014. (DOI:10.14719/pst.2014.1.3.60).
- KOSSLAK, R. M. et al. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 21, p. 7428–7432, 1987. (DOI: 10.1073/pnas.84.21.7428).
- KÖEHLE, H. et al. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: DEHNE, H.W.; GISI, U. et al (Eds.). **Modern fungicides and antifungal compounds III**. Andover, 2002. p. 61-74.
- KUNAL; SHARMA, P. Influence of pesticide-treated seeds on survival of *Mesorhizobium* sp. *Cicer*, symbiotic efficiency and yield in chickpea. **Plant Protection Science**, v. 47, n. 1, p. 37-43, 2011. (DOI: 10.17221/54/2010-pps).
- LOPES, A. M. et al. Insights into the positive effect of pyraclostrobin on sugarcane productivity. **Agronomy**. v. 8, n. 7, artigo 122, 2018. (DOI: 10.3390/agronomy8070122).
- MADIGAN, M. T. et al. Crescimento e controle microbiano. In: MADIGAN, M. T. et al. (Eds.). **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre, 2016. p. 143-182. (ISBN 978-85-8271-298-6).
- MAMENKO, T. P.; KHOMENKO, Y. O.; KOTS, S. Y. Influence of fungicides on activities of enzymes of phenolic metabolism in the early stages of formation and functioning of soybean symbiotic apparatus. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 10, n. 1, p. 111-116, 2019. (DOI: 10.15421/021917).
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13**, de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. 2011a. Acesso em: 16 nov. 2019.
- MASTRODOMENICO, A. T.; PURCELL, L. C. Soybean nitrogen fixation and nitrogen remobilization during reproductive development. **Crop Science**. v. 52, n. 3, p. 1281-1289, 2012. (DOI: 10.2135/cropsci2011.08.0414).
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Capítulo 1. Histórico, evolução e tendências. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: EDITORA UFLA, 2006a. p. 1-16.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Capítulo 9. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: EDITORA UFLA, 2006b. p. 449-542.
- NARAHASHI, T. Neurophysiological effects of insecticides. In: KRIEGER, R. (Ed.) **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. 3 ed. Londres: Academic Press, 2010. p. 799-817. (DOI: doi.org/10.1016/C2009-1-03818-0).

- NCBI. [**Glycine genus**]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3846>>. Acesso em: 11 nov. 2018.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidação de aminoácidos e produção de ureia. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 695–730. (ISBN 978-85-8271-073-9).
- NOGUEIRA, M. A. **Tecnologia da coinoculação**. Entrevistador: A. Alba. Paraná: EMATER, 03 set. 2019. Entrevista realizada no programa de rádio O Homem e a Terra. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/entrevista-de-pesquisador-da-embrapa-soja-exalta-a-eficiencia-da-fbn-no-pais/>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- OLIVER, R. P.; HEWITT, H. G. Fungicide performance. In: OLIVER, R. P.; HEWITT, H. G. (Eds.) **Fungicides in crop protection**. Wallingford: CABI, 2014. p. 71-122.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSEMBERG, E. et al. (Eds.). Chapter 11. **The Prokaryotes - prokaryotic physiology and biochemistry**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 427-451.
- PAVAN et al. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1992. 40 p. (Circular 76). (ISSN: 0100-3356).
- PEREIRA et al. Tratamentos inseticida, peliculização e inoculação de sementes de soja com rizóbio. **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 653-658, 2010. (DOI: 10.1590/S0034-737X2010000500014).
- ROBEA, M. A., et al. Fipronil: mechanisms of action on various organisms and future relevance for animal models studies. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 5, n. 1, p. 30-31, 2018. (DOI: 10.18331/SFS2018.5.1.3).
- SCHULZ, T. J.; THELEN, D. K. Soybean seed inoculant and fungicidal seed treatment effects on soybean. **Crop Science**, v. 48, p. 1975-1983, 2008. (DOI: 10.2135/cropsci2008.02.0108).
- SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. **Analyst**, v. 109, p. 549-568, 1984. (DOI: 10.1039/AN9840900549).
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 141-165.
- SINCLAIR, T. R.; WIT, C. T. Analysis of the carbon and nitrogen limitations to soybean yield. **Agronomy Journal**. v. 68, p. 319-324, 1976. (DOI: 10.2134/agronj1976.00021962006800020021x).
- SUBRAMANIAN, S.; STACEY, G.; YU, O.; Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 282-285, 2007. (DOI: 10.1016/j.tplants.2007.06.006).

- SUZAKI, T.; YORO, E.; KAWAGUCHI, M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 316, p. 111-158, 2015. (DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004).
- TARRANT, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978. (DOI: 10.1139/m78-160).
- THILAKARATHNA, M. S.; RAIZADA, M. N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 177–196, 2017. (DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.11.022).
- UNCTAD (United Nations Conference on Trade and Development). **Soy beans an INFOCOMM commodity profile**. New York and Geneva, 2016. Disponível em: <https://unctad.org/en/Pages/SUC/Commodities/Commodities-Profiles.aspx>. Acesso em: 29 out. 2019.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- WALTHALL, C. et al. **Climate change and agriculture in the United States: effects and adaptation**. USDA Technical Bulletin 1935. Washington, DC. p. 186.
- WARTON, D. I.; WEBER, N. C. Common slope tests for errors-in-variables models. **Biometrical Journal**. v. 44, p. 161–174, 2002. (DOI: 10.1002/1521-4036(200203)44:2<161::AID-BIMJ161>3.0.CO;2-N).
- WARTON, D. I. et al. Bivariate line-fitting methods for allometry. **Biological Reviews**. v. 81, p. 259-291, 2006. (DOI: 10.1017/s1464793106007007).
- WARTON, D. I. et al. smart 3 – an R package for estimation and inference about allometric lines. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 3, p. 257-259, 2012. (DOI: 10.1111/j.2041-210X.2011.00153.x).
- WANG, Y. et al. Nucleotide diversity patterns of three divergent soybean populations: evidences for population-dependent linkage disequilibrium and taxonomic status of *Glycine gracilis*. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 18, p. 3969-3978, 2015. (DOI: 10.1002/ece3.1550).
- ZHANG, Y. M. et al. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6331–6342, 2011. (DOI: 10.1128/aem.00542-11).
- ZILLI, J. E. et al. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 917–923, 2009. (DOI: 10.1590/s0100-06832009000400016).