Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Pré-inoculação e tratamento industrial de sementes: efeito na fixação biológica de nitrogênio, no desenvolvimento e na produtividade da soja

Thaise Dieminger Engroff

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Thaise Dieminger Engroff
Engenheira Agrônoma

Pré-inoculação e tratamento industrial de sementes: efeito na fixação biológica de nitrogênio, no desenvolvimento e na produtividade da soja

Orientador
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciência. Área de concentração: Fitotecnia.

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Engroff, Thaise Dieminger

Pré-inoculação e tratamento industrial de sementes: efeito na fixação biológica de nitrogênio, no desenvolvimento e na produtividade da soja / Thaise Dieminger Engroff - - Piracicaba, 2019.

52 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Glycine max* 2. Inoculante 3. *Bradyrhizobium elkanii* 4. Fungicidas. I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Delci José Engroff e Tereza Berti Dieminger Engroff, por uma vida de dedicação, pelos exemplos de vida, amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Larissa Dieminger Engroff e Rodrigo Dieminger Engroff, pelo amor, incentivo.

A toda minha família e amigos, por serem minha motivação, e por todo o apoio.

Sem vocês nada disso faria sentido!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e por iluminar minha caminhada.

Aos meus pais, Berti e Delci, obrigada pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, por nunca me deixarei desistir, por serem minha maior fonte de inspiração, vocês são meus pilares. Nem todas as palavras são capazes de expressa a gratidão que sinto por vocês. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Larissa e Rodrigo, pelo companheirismo, pela paciência comigo, pelos momentos de risada e por apesar da distância nunca termos perdido essa conexão que existe entre nós! Amo vocês com todo meu coração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Durval Dourado Neto, por me aceitar como sua orientada, por todo o apoio, conhecimentos transmitidos, pelos conselhos e experiência compartilhadas e pela paciência durante esse caminho.

Ao meu grande amigo Felipe Fadel Sartori, pela amizade construída, pelos conselhos, pela paciência, pela colaboração no trabalho, conhecimentos transmitidos, por sempre estar me incentivando a crescer. As palavras escritas aqui representam muito pouco perto de tudo que você fez por mim.

Ao meu Grande amigo Guilherme Felisberto, pelos momentos de descontração, conhecimentos transmitidos, pela colaboração no trabalho, pela ajuda diária, pelo apoio incondicional, pela amizade, meu muito obrigada.

Ao Grupo de Fisiologia Aplicada e Sistema de Produção (GFASP) e seus integrantes: David Bianchini, Fabiana Chrispim, Giuliana Piccirilli, Gustavo Felipe Marques dos Santos, Henrique Lima de Miranda, Lucas Medeiros Raphael, Mariana Monteiro, Mila Pessotto, Pedro Squiapati, Thaís Helena Sanches, Victor Cesar e Vitor Manoel Tome do Nascimento. Obrigada por todo apoio e dedicação, por todos os momentos de aprendizagem e descontração, obrigada pela amizade de vocês, tenho orgulho de ter feito parte dessa equipe!

Aos amigos do Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal: Ana Paula Schwantes, Aline Richart, André Fróes de Borja Reis, Bruno Lago, Danyllo S. Dias, Davi Moscardini, Everton Barbosa, Felipe Schwerz, José Lesme, João Baptistella, Lais Teles, Leandro Zambon, Lucas Nogueira, Márcio Silva, Matheus Graffitti, Renan Caldas Umburanas, Renata Mota, Thais Tomazela, Thalita Cardoso e Walquiria Teixeira, muito obrigada a todos por apoio, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

As companheiras de moradia em Piracicaba Daniele Fontana, Isabella Sabrina, Jackellyne Bruna, Patricia Galletti, Marcela Sant'Anna e Mayara Rodrigues obrigada pelo momentos de descontração, de amizade e pelo apoio nos momentos de dificuldade.

Aos amigos Antônio Neto e Cida MArques, por toda a paciência, toda a ajuda, por fazer-me sentir parte da família de vocês.

Aos Funcionários: Adilson, Ananias, Antônio, César, Claudinei, Cláudio, Daniel, David, Edson, Erreinaldo, Fabio, Helena, João, José, Osvaldo, Rodrigo e Wilson, pela convivência diária e pelo auxilio durante a execução do projeto.

Aos Pesquisadores: Dr. Ângelo Pedro Jacomini (Esalq), Dr. José Laércio Favarin (Esalq), Dr. José Lavres Junior (CENA), Dr. Marcos Trevisan (Esalq), Dr. Paulo Mazzafera (Esalq), Dr. Ricardo Alfredo Kluge (Esalq) e a Dra. Tsai Siu Mui (CENA). Agradeço pelo empréstimo de equipamentos, pela colaboração no desenvolvimento do projeto, pelo auxílio nas análises e na discussão dos resultados.

A Dra. Sharon E. Benes e California State University, Fresno (CSU), pela oportunidade de realização do estágio, e a todos que ajudaram e apoiaram durante esse período na CSU.

Á secretária do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Lopes Toledo, por todo auxilio e cuidado durante o período do mestrado.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ, pelo atendimento e atenção dispensada.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro para a realização do mestrado.

A Agrisus, pelo suporte financeiro para a execução do projeto.

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e também a à Universidade de São Paulo, agradeço pela oportunidade de fazer parte desta instituição!

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Não há nada a temer, pois você não pode fracassar.

Você só pode aprender, crescer e se tornar melhor do que jamais foi."

Hald Erold

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1. CULTURA DE SOJA 13
2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO 14
2.3. TRATAMENTO INDUSTRIAL DE SEMENTES 17
3. MATERIAL E MÉTODOS 19
3.1. EXPERIMENTOS 19
3.2. DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS E DELINEAMENTO ESTATÍSTICO 22
3.3. AVALIAÇÕES 23
3.3.1. Número e massa de nódulos *23*
3.3.2. Massa de matéria seca de planta *23*
3.3.3. Atividade da enzima nitrogenase *23*
3.3.4. Quantificação de nitrogênio *24*
3.3.4.1. Nitrato 24
3.3.4.2. Ureídeos 24
3.3.5. Componentes de produção *24*
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 25
4. RESULTADOS 27
4.1. EXPERIMENTO I 27
4.2. EXPERIMENTO II EM CAMPO, NITOSSOLO E IRRIGAÇÃO VIA PIVÔ CENTRAL 30
4.3. EXPERIMENTO III EM CAMPO, ARGISSOLO E SEM IRRIGAÇÃO 33
5. DISCUSSÃO 37
6. CONCLUSÃO 41
REFERÊNCIAS 43

RESUMO

Pré-inoculação e tratamento industrial de sementes: efeito na fixação biológica de nitrogênio, no desenvolvimento e na produtividade da soja

O tratamento de sementes de soja tem grande adoção e relevância no Brasil. Nesse contexto, o tratamento industrial de sementes vem com a advento de trazer facilidade aos produtores de soja em questões relacionadas à logística, à qualidade e à possibilidade de maximizar a produtividade de grãos. O tratamento industrial de sementes permite a associação de diferentes xenobióticos com inoculantes, porém há muitas dúvidas em relação aos efeitos dessa associação, principalmente entre fungicidas e inoculantes. Com o exposto, o presente trabalho teve por objetivo estudar como o armazenamento de sementes inoculadas e o tratamento de sementes, influencia a fixação biológica de nitrogênio (FBN), o desenvolvimento de plantas e a produtividade na cultura da soja. Um experimento em vaso e dois experimentos em campo foram conduzidos para avaliar a nodulação, concentração de ureídeos, eficiência da fixação biológica de nitrogênio, atividade da nitrogenase, biomassa de plantas, produtividade e massa de mil grãos. Tanto o armazenamento de sementes pré-inoculadas, como o uso de produtos comerciais no tratamento de sementes influenciaram variáveis relacionadas à FBN nos três experimentos. Considerando-se os componentes de produção da cultura, o armazenamento influenciou a massa de mil grãos, enquanto os tratamentos de sementes influenciaram a produtividade apenas aos 30 dias de armazenamento.

Palavras-chave: *Glycine max;* Inoculante; *Bradyrhizobium elkanii* ; Fungicidas

ABSTRACT

Pre-inoculation and industrial seed treatment: effect in the nitrogen biological fixation, development and soybean productivity

The treatment of soybean seeds has been widely adopted and is relevant in Brazil. In this context, the industrial treatment of seeds comes with the advantage of making it easier for soybean growers in matters related to logistics, quality and the possibility of maximizing grain yield. Industrial seed treatment allows the association of different xenobiotics with inoculants, but there are many doubts regarding the effects of this association, especially between fungicides and inoculants. With the above, the present work aimed to study how the storage of inoculated seeds and seed treatment influenced the biological nitrogen fixation (BNF), plant development and yield in soybean crop. One pot experiment and two field experiments were conducted to evaluate nodulation, ureides concentration, biological nitrogen fixation efficiency, nitrogenase activity, plant biomass, yield and one thousand grain mass. Both the storage of pre-inoculated seeds and the use of commercial products in seed treatment influenced variables related to BNF in the three experiments. Considering the crop production components, storage influenced the mass of one thousand grains, while seed treatments influenced the yield only at 30 days of storage.

Keywords: *Glycine max* ;Inoculant; *Bradyrhizobium elkanii* ;Fungicides

1. INTRODUÇÃO

A cultura de soja (*Glycine max* (L.) Merril) representa grande importância nacional e internacional, com destaque para a produção de proteína para alimentação animal. Com a crescente demanda global por alimentos e a restrição ao aumento da área cultivada, faz-se necessária a melhor utilização dos recursos existentes e otimização da produtividade das culturas como a soja.

O tratamento industrial de sementes (TIS) aparece como uma nova opção no mercado para os produtores, criando facilidades relacionadas à logística, à segurança, e à qualidade (HENNING et al., 2010). O TIS permite a utilização das mais avançadas tecnologias para a realização do tratamento de sementes, e o uso de formulações contendo diversos xenobióticos como fungicidas, inseticidas, nematicidas, polímeros, micronutrientes, bioestimulantes e inoculantes no mesmo tratamento (FRANÇA-NETO et al., 2015).

A prática da inoculação é amplamente difundida e utilizada pelos produtores de soja no Brasil (HUNGRIA et al., 2005). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) permite uma redução dos custos da cultura (ZILLI et al., 2010), uma vez que resulta em um aporte de N suficiente para obtenção de altas produtividades de grãos e substitui a adubação nitrogenada mineral (HUNGRIA et al., 2005).

O processo de FBN é realizado por bactérias conhecidas como rizóbios, que são capazes de formar nódulos nas raízes de plantas pertencentes à família das fabáceas (leguminosas, na antiga classificação) (ZAHRAN, 1999; SADOWSKY, 2005).

O estabelecimento da simbiose entre o hospedeiro e o microssimbionte envolve um complexo diálogo molecular. Inúmeras mudanças na expressão gênica ocorrem em ambos durante o processo de nodulação (VANCE, 2002). Após o nódulo formado, uma gama de enzimas são sintetizadas, com destaque para a nitrogenase, a qual é responsável pela quebra da tripla ligação do N_2, ou seja, o processo de fixação propriamente dito (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). A nitrogenase catalisa a quebra da tripla ligação altamente estável do nitrogênio molecular (N_2), o que resulta na produção duas moléculas de amônia (NH_3), as quais são fornecidas às plantas para sintetizar os compostos nitrogenados (DIGHE et al., 2010).

Diversas variáveis podem interferir no processo de fixação influenciando a eficiência do processo, especialmente em regiões tropicais, como fatores edafoclimáticos, práticas de manejo e também o tratamento de sementes com fungicidas antes da inoculação (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; ZILLI et al., 2009).

Os fungicidas em associação a inoculação nem sempre apresentam resultado benéfico, uma vez que pode haver incompatibilidade por toxidez às bactérias nodulantes de soja (ANDRÉS;

CORREA; ROSAS, 1998). Kecskes e Vincent (1969) relataram que alguns fungicidas, além de inibir o desenvolvimento das bactérias, também são letais para esses microrganismos. Dependendo de alguns fatores como ingrediente ativo, textura do solo e histórico de cultivo das áreas, pode haver uma redução de nodulação superior a 80% e da produtividade de grãos superior a 20% (CAMPO; ARAÚJO; HUNGRIA, 2009; ZILLI et al., 2009).

Campo, Araújo e Hungria (2009) relatam que um dos maiores problemas do tratamento de sementes é a incompatibilidade entre fungicidas e o inoculante. Com a adesão dos produtores ao tratamento industrial de sementes, essa associação se torna preocupante devido ao fato de haver poucos estudos em relação ao efeito do tempo de armazenamento de sementes tratadas e inoculadas.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de fungicidas em associação com inoculantes, e o armazenamento de sementes, na fixação biológica de nitrogênio, desenvolvimento e produtividade da cultura de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura de soja

A soja (*Glycyne max* (L.) Merril) é uma planta herbácea pertence à família Fabaceae, originária da região noroeste da China (Manchúria) (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). No Brasil, a cultura tomou proporções econômicas em 1949 aparecendo na estatística mundial com 25 mil toneladas (FARIAS; NEUMAIER; NEPOMUCENO, 2009). A cultura hoje tem destaque fundamental no agronegócio brasileiro, e é também uma das principais *commodities* mundiais devido à sua versatilidade de uso nos mais diferentes segmentos (RIGO et al., 2015), como alimentação humana e animal, além de constituir a matéria-prima básica de diversos setores da indústria.

Nas últimas décadas, o Brasil acompanhou o crescimento do consumo de soja no mundo aumentando sua área, produção e produtividade. Nos últimos 20 anos, o incremento de área semeada foi superior a um milhão de hectares por ano, o que correspondeu a um aumento percentual de 9% ao ano entre as safras de 1996/1997 a 2016/2017. O aumento da produção no mesmo período foi de 13,4%, ou seja, mais de três milhões de toneladas por ano, acompanhado também do aumento da produtividade da cultura, que foi de 32,7 kg ha^{-1} ano^{-1} (BALBINOT et al., 2017).

Em termos econômicos, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA (CNA, 2015) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (MAPA, 2015), divulgaram que, em 2014, a venda dos produtos que compõem o complexo soja (soja em grão, óleo e farelo) somaram US$ 31,4 bilhões, representando 13% da receita total de exportação do Brasil.

No Brasil, na safra 2018/2019, foram semeadas mais de 35 milhões de hectares. A produção de soja para essa mesma safra, segundo a Companhia Nacional do Abastecimento – CONAB, foi de 115 milhões de toneladas, resultando em uma produtividade média de 3.208 kg ha^{-1} (CONAB, 2019).

Uma das grandes vantagens competitivas da soja frente à outras culturas é a baixa utilização de fertilizante nitrogenado devido à associação da cultura com a bactéria *Bradyrhizobium* sp., responsável pela fixação biológica de N (ZUFFO et al., 2015). O sucesso de todo complexo ainda é dependente de diversas condições, porém para alcançar altas produtividade a cultura de soja demanda de um suprimento de N adequado já que esse é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura de soja. Em média, os grãos de soja possuem de 37 a 42% de proteína, podendo atingir 52%, e teor de óleo entre 17 a 22%. Dessa forma, estima-se que sejam necessários

80 kg de N para produzir 1000 kg de grãos de soja (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; SALVAGIOTTI et al., 2008).

O nitrogênio disponível às plantas é proveniente tanto do solo como da FBN. A quantidade de nitrogênio disponibilizado pelo solo pode variar de acordo com alguns fatores como matéria orgânica, textura, clima da região e quantidade e qualidade de resíduos vegetais. Pesquisas mostram que o solo pode fornecer entre 15 a 60 kg ha^{-1} de N à cultura de soja (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2006) enquanto a FBN contribui com 70 até 200 kg ha^{-1} de N, reforçando a sua importância para a soja e o agronegócio brasileiro (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008; ALVES et al., 2006; UNKOVICH; PATE, 2000).

2.2. Fixação biológica de nitrogênio

A Fixação biológica de nitrogênio é descrita como uma interação simbiótica entre plantas e bactérias que consiste na transformação do N_2 atmosférico em amônia (NH_3). O tipo mais comum de simbiose ocorre entre as espécies da família Fabaceae (leguminosas) e as bactérias do solo dos gêneros *Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium* e *Sinorrhizobium* (CHUEIRE et al., 2003; REES et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2017). O *Bradyrhizobium* é o principal gênero dessas bactérias usadas para a inoculação de plantas de soja. No Brasil, são recomendadas três espécies de *Bradyrhizobium* para inoculação de soja, *B. diazoefficiens, B. elkani* e *B. japonicum* e pelo menos duas estirpes de cada espécie (MENDES et al., 2014). Na cultura de soja, a contribuição do nitrogênio proveniente da FBN pode variar de 0 a 98% (CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018).

Com o processo de fixação do nitrogênio, calcula-se uma economia estimada de 12 milhões de dólares por ano no Brasil, uma vez que a FBN resulta em um aporte suficiente para obtenção de altas produtividades de grãos, substituindo a adubação nitrogenada mineral (EMBRAPA, 2019). A inoculação também contribui para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pela redução da emissão de gases poluentes devido a redução do uso de adubos nitrogenados, e porque o N proveniente da FBN é usado diretamente pela planta, sendo menos susceptível à volatilização, desnitrificação e lixiviação (RENGEL, 2002).

O estabelecimento da simbiose engloba um complexo diálogo molecular entre planta e bactéria, envolvidos no surgimento e na regulação de uma nova estrutura nas raízes das plantas, o nódulo, onde acontece as trocas de C e N entre a planta e a bactéria. A interação é iniciada com a aproximação das bactérias em direção às raízes em resposta à liberação de compostos chamados de (iso)flavonoides, secretado pelo sistema radicular da planta hospedeira. Esse contato induz os rizóbios à expressão dos genes associados à nodulação, chamados genes *nod*. Os genes *nod* ativados codificam as proteínas de nodulação (fatores *Nod*), que ativam as lecitinas, receptores das

leguminosas, possibilitando a ligação do rizóbio à parede celular dos pêlos radiculares (FAGAN et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2017). A percepção dos fatores *Nod* ativa a expressão dos genes de nodulação na planta, desencadeando uma série de mudanças, como o encurvamento da extremidade apical do pêlo radicular, despolarização da membrana celular, reorientação do citoesqueleto, aumento do cálcio intracelular, divisão das células corticais jovens e formação do cordão de infecção (STACEY et al., 2006).

A bactéria aderida ao pêlo radicular libera uma substância que causa a hidrólise da parede celular da planta e, nesse local, a membrana plasmática cresce para dentro, sofrendo invaginação. Dessa maneira, uma estrutura tubular é formada e as bactérias entram na planta alcançando o cordão de infecção. O cordão de infecção cresce em direção à base do pêlo radicular e, ao atingir as células corticais, penetra-as pelo mesmo mecanismo de hidrólise usado para iniciar o cordão de infecção, que cresce até o primórdio do nódulo onde as bactérias serão liberadas nas células da planta. As bactérias sofrem transformações morfológicas e fisiológicas, como a perda dos flagelos, e passam a ser denominadas bacteroides (MINAMI et al., 1996).

Os bacteroides são envolvidos por tecidos, dentre eles o tecido central onde os bacteroides ficam hospedados. Esse tecido é composto por dois tipos de células: as infectadas e as não infectadas. O tipo de células infectadas é onde se encontram os bacteroides e a fixação biológica de nitrogênio ocorre. São poucas as camadas das células não infectadas. Essa camada é denominada limite, pois separa o tecido central do parênquima nodular, e são responsáveis pelo transporte do nitrogênio fixado (YANG; BISSELING, 1995).

O processo culmina com a ativação dos genes *nif*, responsáveis por codificar as unidades formadoras da enzima nitrogenase, a qual catalisa o N_2 (SADOWSKY; GRAHAM; SUGAWARA, 2013). A nitrogenase é irreversivelmente inibida pelo oxigênio atmosférico (O_2), e os microrganismos possuem um mecanismo de proteção a favor da enzima. Essa proteção é realizada pelo leghemoglobina, proteína localizada em um tecido envolto ao bacteroide. Composta por uma heme proteína, a leghemoglobina que tem alta afinidade pelo O_2 presente nos nódulos, sendo responsável pelo transporte e manutenção dos níveis de oxigênio na célula a taxas que permitem que ocorram os processos de respiração do bacteroide e o funcionamento da nitrogenase (EHRHARDT; WAIS; LONG, 1996; LARRAINZAR et al., 2015).

Somente bactérias contendo a enzima nitrogenase podem reduzir o N_2 a amônia. Essa é a única enzima conhecida que pode realizar tal reação energeticamente desfavorável (SADOWSKY; GRAHAM; SUGAWARA, 2013). A redução enzimática do N_2 pela nitrogenase requer 8 elétrons e, portanto, 16 ATP, devido a tripla ligação entre os átomos de N, para produzir duas moléculas de NH_3 (TAIZ; ZEIGER, 2017). Para comprovar o gasto energético da FBN,

Silsbury (1977) demostrou, a partir do consumo de carbono, que plantas de soja que obtêm N exclusivamente mineral necessitam de 510 mg de CO_2 para produzir 1 g de material vegetal seco, e as plantas que obtêm N exclusivamente da FBN necessitam de 300 mg a mais de CO_2, ou seja elas precisam de 810 mg de CO_2 para produzir a mesma quantidade de material vegetal seco.

Os ureídeos são os principais produtos finais do processo de fixação biológica em soja (DUNN, 2015). O N_2 fixado pela nitrogenase e transformado em NH_3 é protonado em NH_4^+ e exportado para o citossol da célula infectada pelo nódulo através da membrana do simbionte (UDVARDI; POOLE, 2013). Uma vez no citossol das células do nódulo infectado, o NH_4^+ é enzimaticamente convertido em glutamina (Gln) pela glutamina sintase (GS), (CHUNGOPAST et al., 2014; LOTHIER et al., 2011). Os níveis elevados de glutamina nos plastídios estimulam a ativação da glutamato sintase (GOGAT), produzindo duas moléculas de glutamato. O nitrogênio na forma de glutamina e glutamato é transferido para outros compostos (citrulina - ureídeos, alantoína e ácido alantoico) por meio de reações de transaminação(CHEN et al., 2013). Uma vez que esses compostos começam a se acumular, são transferidos para as áreas de demanda da planta por meio do xilema (BARAL; SILVA; PAUDYAL, 2012; BARAL; TEIXEIRA; GUPTA, 2014).

Os ureídeos (alantoína e ácido alantoico) podem representar até 90% do nitrogênio total transportado no xilema das plantas leguminosas. São considerados um dos principais compostos transportadores de N em fabáceas (leguminosas) e podem se acumular em altas concentrações nos diferentes órgãos da planta (BARAL; SILVA; IZAGUIRRE-MAYORAL, 2016; BARAL; IZAGUIRREMAYORAL, 2017). Alta concentração de ureídeo nos nódulos e na seiva do xilema é considerado uma indicação de eficácia da simbiose entre o rizóbio e seu hospedeiro. Essa é uma ferramenta para se avaliar a fixação biológica de nitrogênio em plantas (BARAL; IZAGUIRREMAYORAL, 2017; IZAGUIRRE-MAYORAL; LAZAROVITS; BARAL, 2018).

Entretanto, vários fatores podem interferir no processo de FBN e influenciar a eficiência do processo, especialmente em regiões tropicais, como fatores edafoclimáticos, práticas de manejo e também o tratamento de sementes com fungicidas antes da inoculação (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; ZILLI et al., 2009).

Os fungicidas em associação à inoculação nem sempre apresentam resultado benéfico, uma vez que pode haver incompatibilidade por toxidez às bactérias nodulantes de soja (ANDRÉS; CORREA; ROSAS, 1998). Kecskes e Vincent (1969) relataram que alguns fungicidas, além de inibir o desenvolvimento das bactérias, também são letais para esses microrganismos. Dependendo de alguns fatores como ingrediente ativo, textura do solo e histórico de cultivo das áreas, pode haver uma redução de nodulação superior a 80% e da produtividade de grãos superior a 20% (CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; ZILLI et al., 2009).

2.3. Tratamento Industrial de sementes

O tratamento industrial de sementes (TIS) consiste na aplicação de ingredientes químicos e/ou orgânicos nas sementes visando o controle de patógenos, insetos ou outras pragas, utilizando equipamentos altamente sofisticados para aplicação de produtos (ABRASEM, 2014), além de permitir o armazenamento das sementes já tratadas por períodos prolongados sem grandes riscos de perdas de qualidade fisiológica (PICCINI et al., 2013).

Na safra 1991/1992, o tratamento de sementes era realizado em somente 5% das áreas semeadas com soja. Contudo, na safra 2014/2015, das áreas semeadas, 90-95% receberam o tratamento de sementes com fungicidas (HENNING et al., 2010). O tratamento industrial de sementes tem muita aceitação por parte dos produtores devido vantagens em relação ao tratamento *on-farm* como comodidade ao cliente, facilidades relacionadas à logística, segurança e a possibilidade de maximizar produtividade, maior precisão no volume de calda, melhor cobertura e aderência dos produtos a semente e maior rapidez no processo de tratamento (FRANÇA-NETO et al., 2015, HENNING, 2012).

A alta tecnologia empregada no tratamento industrial permite o uso formulações contendo diversos xenobióticos, como fungicidas, inseticidas, nematicidas, micronutrientes, bioestimulantes, inoculantes, protetores, corantes entre outros produtos(FRANÇA-NETO et al., 2015).

A camada protetora fornecida pelo tratamento das sementes com fungicidas garante o controle de patógenos e também um melhor desempenho da cultura nas suas fases iniciais, e um crescimento mais vigoroso, determinante para o estabelecimento do estande da cultura e o melhor aproveitamento do potencial genético e produtivo das sementes (CASTRO et al., 2008; LUDWING, 2017).

Hoje, as formulações comerciais de fungicidas, de maneira geral, incluem múltiplos ingredientes ativos para controle de diferentes patógenos, por exemplo, metalaxil e outras fenilamidas são utilizados no controle de fungos oomicetos (DORRANCE; MCCLURE, 2001; DORRANCE et al., 2009), enquanto fungicidas, como benzimidazóis, fludioxonil e estrobilurinas são utilizados no manejo de fungos como *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia* sp. (BRODERS et al., 2007; DORRANCE et al., 2003; ELLIS et al., 2011). As opções de produtos comerciais que contem fungicidas em sua formulação para o tratamento de sementes de soja é vasto. Dentre os mais utilizados pelos produtos, podem ser citados Derosal Plus®, Protreat®, Vitavax-Thiram®, Standak Top®, Maxim Advanced® e Certeza® (GOULART, 2010).

A semente é um dos mais importantes meios de disseminação de patógenos devido a uma parcela significante de agentes patogênicos associados a ela. Os fungos são os agentes mais

comumente transmitidos pelas sementes, seguidos pelas bactérias, vírus e nematoides. A semeadura de uma semente infectada faz com que o patógeno tenha sua introdução assegurada no local, e essa semente permite a incidência de doenças já nos estádios iniciais da cultura. Por isso, o tratamento de semente tem como objetivo a redução do inóculo veiculado a ela (TANAKA; MACHADO, 1985; MACHADO, 2000).

Com a entrega de sementes já tratadas com fungicidas e outros agrotóxicos na propriedade, é comum a não utilização de inoculante pelo produtor. Tal fato motivou o desenvolvimento dos conhecidos "inoculantes longa vida", os quais, em teoria, permitem a pré-inoculação da semente por meio do tratamento industrial por períodos de até 60 dias. Contudo, há poucos trabalhos disponíveis na literatura que relatam o efeito do armazenamento de sementes tratadas e pré-inoculadas por até 30 dias. Araujo et al. (2017), utilizando tecnologias específicas para TIS com inoculação junto à piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, observaram redução de $6,7x10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) por semente no início do período de armazenamento (aos zero dias) para $2,3x10^3$ UFC $semente^{-1}$ aos 28 dias de armazenamento. No entanto, em experimentos a campo, tal redução não causou decréscimo no número de nódulos em três de quatro experimentos, quando comparados à inoculação no dia da semeadura. É interessante notar que, nas três áreas onde não houve diferença estatística significativa, duas delas apresentavam número mais provável (NMP) de células na ordem de 10^4 g^{-1}, enquanto apenas uma delas apresentava 10^1 g^{-1}. Ainda, em um dos experimentos com NMP na ordem de 10^4 g^{-1}, tanto o tratamento de 0 como o de 30 dias foram estatisticamente superiores ao tratamento sem o uso de inoculante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimentos

O presente estudo foi conduzido a campo e em vasos, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP (22°42' S, 47°30' W). O clima da região é caracterizado como Cwa segundo a classificação climática de W. Köppen (ALVARES et al., 2013), com precipitação média anual de aproximadamente 1.328 mm, e temperatura média anual de 21,6ºC (CEPAGRI, 2019).

No experimento em vaso (experimento I), utilizou-se a variedade cultivada M-8644-IPRO, com hábito de crescimento determinado, com grau de maturação de 8.6. Foram utilizados vasos de fundo perfurado de 8 L, com dimensões 0,23 m de diâmetro e 0,23 m de profundidade. Para evitar a perda de substrato, os vasos foram forrados com um tecido permeável. A parcela foi constituída por 4 vasos contendo três plantas. Para o preparo do substrato foi usado uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1, cuja características químicas são apresentadas na Tabela 1. A mistura do substrato foi feita manualmente em cima de uma superfície limpa com o auxílio de enxadas.

Tabela 1. Resultado da análise química de macronutrientes (teor de P, K, Ca, Mg - $mmol_c\ dm^{-3}$ - e S-SO_4 - mg dm^{-3}), pH (em $CaCl_2$), teor de matéria orgânica (M.O., g dm^{-3}), saturação por bases (V, %), saturação por alumínio (m, %) e capacidade de troca catiônica (CTC, $mmol_c\ dm^{-3}$) do substrato utilizado no experimento I, conduzido em vaso.

pH $CaCl_2$	M.O.	P Resina	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma bases	CTC	V	m	S SO_4
	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------	----------	----------	$mmol_c\ dm^{-3}$	----------	----------	----------	%	%	mg dm^{-3}
5,4	5	13	1,6	9	6	11	0	17	28	60	0	4

A semeadura do experimento I foi realizada no dia 23 de fevereiro de 2018, semeando-se 20 sementes por vaso, realizando-se, após a emergência das plântulas, o desbaste. O substrato teve seu pH corrigido para 7 com a adição de 400 kg ha^{-1} (PRNT 70%) de calcário. A adubação utilizada foi calculada com base no volume de 8 L do vaso, adicionando-se 400 kg ha^{-1} de P_2O_5 e 103 kg ha^{-1} de K_2O, parcelada em três vezes. Nenhum fertilizando nitrogenado foi adicionado ao longo do ciclo da cultura.

Durante o ciclo da cultura, foram feitas três aplicações em diferentes estádios fenológicos da cultura de soja para controle de pragas e doenças, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos produtos aplicados na cultura de soja no período experimental para manejo de pragas e doenças no Experimento I, em vasos.

Data	Ingrediente ativo	Dose
19/03/2018	Lambda Cialotrina	80 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
08/04/2018	Lambda Cialotrina	80 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Fluxapiroxade + Piraclostrobina	350 mL ha^{-1}
03/05/2018	Lambda Cialotrina	80 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Piraclostrobina + Epoxiconazol	600 mL ha^{-1}

Os experimentos II e III, em campo, foram conduzidos em Nitossolo eutroférrico e Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, respectivamente. A variedade cultivada utilizada foi a TMG-7062 IPRO RR2, com maturação relativa de 6.2 e crescimento semideterminado. No experimento II, a irrigação foi realizada via pivô central, enquanto o experimento III foi cultivado em sequeiro.

O preparo do solo foi igual para as diferentes áreas, sendo realizado dias antes da semeadura a aração e gradagem, seguida da abertura dos sulcos com tração mecânica. A adubação seguiu as exigências da análise de solo e foi realizada um dia antes da semeadura. No experimento II foram aplicados 267 kg ha^{-1} da formulação NPK 0-15-11, e 533 kg ha^{-1} da formulação NPK 0-15-11 no experimento III, distribuídos e incorporados manualmente ao sulco de semeadura. As características físicas e químicas do solo são apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Resultado da análise química de macronutrientes (teor de P, K, Ca, Mg - $mmol_c\ dm^{-3}$ - e S-SO_4 - mg dm^{-3}), pH (em $CaCl_2$), teor de matéria orgânica (M.O., g dm^{-3}), saturação por bases (V, %), saturação por alumínio (m, %) e capacidade de troca catiônica (CTC, $mmol_c\ dm^{-3}$) do solo utilizado no experimento II, conduzido em campo.

pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma	CTC	V	m	S
$CaCl_2$		Resina						bases				SO_4
	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------	----------	----------	$mmol_c\ dm^{-3}$	----------	----------	----------	%	%	mg dm^{-3}
6,1	18	41	5,3	36	21	15	0	62	77	81	0	8

Tabela 4. Resultado da análise química de macronutrientes (teor de P, K, Ca, Mg - $mmol_c\ dm^{-3}$ - e S-SO_4 - mg dm^{-3}), pH (em $CaCl_2$), teor de matéria orgânica (M.O., g dm^{-3}), saturação por bases (V, %), saturação por alumínio (m, %) e capacidade de troca catiônica (CTC, $mmol_c\ dm^{-3}$) do solo utilizado no experimento III, conduzido em campo.

pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma	CTC	V	m	S
$CaCl_2$		resina						bases				SO_4
	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------	----------	----------	$mmol_c\ dm^{-3}$	----------	----------	----------	%	%	mg dm^{-3}
5,0	5	11	1,3	6	6	31	1	13	44	30	7	6

Os experimentos foram semeados no dia 20 de novembro de 2018. A semeadura foi realizada manualmente, semeando-se 17 sementes por metro, e após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste para que a população final fosse de 9 plantas por metro. As parcelas foram constituídas de 5 linhas de 5 m espaçadas em 0,45 m. A área útil da parcela foi considerada as três fileiras centrais, eliminando um metro em cada extremidade das mesmas como bordadura.

O manejo da cultura foi realizado com aplicações de herbicidas, inseticidas e fungicidas. As datas, ingredientes ativos e doses de produtos comerciais utilizados estão descritos na Tabelas 5 e 6. A colheita foi realizada com o auxílio de uma colhedora de parcelas, no dia 20 de março de 2019.

Tabela 5. Descrição dos produtos aplicados na cultura de soja no período experimental para manejo de pragas, doenças e plantas daninhas no Experimento II.

Data	Ingrediente ativo	Dose
14/12/2018	Glifosato	3000 mL ha^{-1}
	Teflubenzurom	150 mL ha^{-1}
	Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	500 mL ha^{-1}
27/12/2018	Glifosato	3000 mL ha^{-1}
	Alfa-cipermetrina	120 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Teflubenzurom	150 mL ha^{-1}
	Fluxapiroxade + Piraclostrobina	350 mL ha^{-1}
15/01/2019	Alfa-cipermetrina	120 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Teflubenzurom	150 mL ha^{-1}
	Fluxapiroxade + Piraclostrobina	350 mL ha^{-1}
	Mancozeb	3 kg ha^{-1}
29/01/2019	Acefato	1 kg ha^{-1}
	Imidacloprido + Beta-ciflutrina	1000 mL ha^{-1}
13/03/2019	Saflufenacil	0,14 kg ha^{-1}

Tabela 6. Descrição dos produtos aplicados na cultura de soja no período experimental para manejo de pragas, doenças e plantas daninhas no Experimento III.

Data	Ingrediente ativo	Dose
27/12/2018	Glifosato	3000 mL ha^{-1}
	Alfa-cipermetrina	120 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Teflubenzurom	150 mL ha^{-1}
	Fluxapiroxade + Piraclostrobina	350 mL ha^{-1}
15/01/2019	Alfa-cipermetrina	120 mL ha^{-1}
	Flubendiamida	70 mL ha^{-1}
	Teflubenzurom	150 mL ha^{-1}
	Fluxapiroxade + Piraclostrobina	350 mL ha^{-1}
	Mancozeb	3 kg ha^{-1}
29/01/2019	Acefato	1 kg ha^{-1}
	Imidacloprido + Beta-ciflutrina	1000 mL ha^{-1}
13/03/2019	Saflufenacil	0,14 kg ha^{-1}

3.2. Descrição dos tratamentos e delineamento estatístico

Os experimentos foram compostos por 8 tratamentos e 4 repetições, em esquema fatorial e delineamento de blocos casualizados (DBC). O fator 1 se referiu às combinações dos diferentes produtos comerciais utilizados como tratamento de sementes de soja. Já o fator 2 se refere ao tempo de armazenamento (0 e 30 dias) anterior à semeadura de sementes inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii*.

Os produtos comerciais utilizados foram: (i) controle sem produto comercial (PC_0); (ii) tiofanato-metílico + piraclostrobina + fipronil (PC_1 – 2 mL kg^{-1} de semente); (iii) metalaxil-M + tiabendazol + fludioxonil (PC_2 – 1,25 mL kg^{-1} de semente); e (iv) carbendazim + tiram (PC_3 – 2 mL kg^{-1} de semente).

Para inoculação das sementes de todos os tratamentos, utilizou-se inoculante turfoso à base de *Bradyrhizobium elkanii* ($5x10^9$ UFC g^{-1}; 4 g kg^{-1} de semente). Ademais, polímero espalhante (3 mL kg^{-1} de semente), osmoprotetor (3 mL kg^{-1} de semente) e pó-secante (4 g kg^{-1} de semente) foram adicionados em todos os tratamentos na seguinte ordem: primeiramente, foram homogeneizados os pesticidas com o polímero espalhante e osmoprotetor, aplicando a solução resultante nas sementes. Posteriormente, ainda com as sementes úmidas, foi adicionado o inoculante. Ao final, após a mistura com o inoculante, foi adicionado o pó-secante.

3.3. Avaliações

Para o experimento I, foram realizadas as seguintes avaliações nos estádios fenológicos V_4 e V_7 (FEHR et al., 1971; RITCHIE et al., 1977): número e massa de nódulos; massa de matéria seca da parte aérea; quantificação de nitrogênio (soluto) em plantas.

Nos experimentos II e III, foram realizadas as seguintes avaliações nos estádios fenológicos V_4 e R_3 (FEHR et al., 1971; RITCHIE et al., 1977): atividade da enzima nitrogenase; massa de matéria seca da parte aérea; quantificação de nitrogênio (soluto) em plantas; e componentes de produção e produtividade.

3.3.1. Número e massa de nódulos

No experimento I, o número de nódulos e a massa de nódulos foram obtidos coletando-se três plantas de um vaso com as raízes intactas. As raízes foram lavadas, e os nódulos separados e contados. Os nódulos foram secos em câmara de fluxo contínuo de ar quente por 72 horas a 60ºC para determinação da massa de matéria seca de nódulos.

3.3.2. Massa de matéria seca de planta

Nos experimentos I, II e III, cinco plantas da área útil da parcela ou de um vaso foram coletadas. Posteriormente, realizou-se a separação das folhas da haste. Após isso, estas foram secas em estufa de fluxo contínuo de ar quente por 72 horas a 60°C para determinação da massa de matéria seca de parte aérea média de plantas.

3.3.3. Atividade da enzima nitrogenase

Nos experimentos II e III, para avaliação desse parâmetro, a metodologia utilizada foi descrita por Boddey et al. (2001), a qual consiste na determinação de forma indireta pela técnica de redução do acetileno (ARA). As raízes coletadas e os nódulos foram cuidadosamente separados e colocados em frasco hermeticamente fechados, no valor de aproximadamente 0,5 g de nódulos. Com o auxílio de uma seringa, 4 mL foram retirados (cerca de 10% da fase gasosa do frasco) e a mesma quantidade de gás acetileno, com pureza de 98-99% foi injetado, deixando os nódulos incubados na atmosfera modificada dentro do frasco por 1h. Para obtenção da concentração de gás etileno formado no frasco, 1 mL da fase gasosa foi retirada com seringa de 1 mL, e injetado em um cromatógrafo a gás (*Thermo Finnigan®*, *model Trace 2000GC*). Gás padrão de etileno foi utilizado para elaboração da curva. Os dados foram transformados para log10.

3.3.4. Quantificação de nitrogênio

Após a mensuração da massa de matéria seca de plantas, as hastes e os pecíolos foram processados em moinho de bancada tipo Whilly. Então, 1.000 mg de material vegetal foram transferidos para tubos Falcon e adicionados 10 mL de água Milliq. Após esse procedimento, o material foi incubado a 45°C durante 1 hora e, posteriormente, centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos (TEIXEIRA et al., 2018). Ao final, o sobrenadante foi separado e armazenado em freezer para posterior avaliação de nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) e ureídeos.

3.3.4.1. Nitrato

A determinação de nitrato foi realizada por meio da metodologia do ácido salicílico proposta por Cataldo et al. (1975), adaptada por Teixeira et al. (2018). Para esse procedimento, foram adicionados a um tubo de ensaio 50 µL da amostra e 200 µL de solução contendo ácido salicílico (5%) + ácido sulfúrico concentrado. O tubo de ensaio permaneceu em repouso durante 20 minutos e, após esse período foi adicionado 4,75 mL de NaOH (2 N). A solução foi agitada vigorosamente e após 10 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. Os teores de nitrato foram obtidos a partir de curva padrão de KNO_3 (25 mM).

3.3.4.2. Ureídeos

O teor de ureídeos foi determinado com base no método proposto por Young e Conway (1942), adaptada por Teixeira et al. (2018), foi utilizado 1 mL da amostra, que foi adicionada a tubo de ensaio. Depois, foram adicionados 200 µL de NaOH (0,5 N), colocando-se a solução em banho-maria a 100ºC durante dez minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 400 µL de solução contendo HCl (0,65 N) + cloridrato de fenil-hidrazina (0,33%). A solução foi então homogeneizada e colocada novamente em banho-maria (100ºC) durante dois minutos. Logo após, foram colocados em banho de gelo por 15 minutos, e ao final foi adicionado 1 mL de solução contendo ferrocianeto de potássio (1,67%) + HCl (10 N). O tubo de ensaio foi agitado, e após 10 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 525 nm. Os teores de ureídeos foram obtidos a partir de curva padrão de alantoína 1 mM.

3.3.5. Componentes de produção

Os componentes de produção avaliados foram: massa de mil grãos e produtividade. No final do ciclo da cultura, coletou-se a área útil da parcela, com o auxílio de uma colhedora de parcelas, e após isso os grãos colhidos foram pesados em balança digital. Foi determinado o teor

de água dos grãos e efetuado o cálculo de produtividade (produção por unidade de área) com o teor de água corrigido para 13%. Após, foi realizada a contagem de cinco repetições de cem grãos de cada parcela e os valores foram extrapolados para mil.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software livre R Studio, R Core Team (2013). Modelos lineares generalizados de efeitos mistos foram utilizados por meio do pacote lme4 (função glmer) para se comparar tempo de armazenamento de sementes inoculadas e tratamento de sementes, os quais foram considerados efeitos fixos do modelo. Quando os fatores de efeito fixo apresentaram diferença ou interação entre eles ($p<0,1$), a análise foi desdobrada e comparada por meio do teste de média dos quadrados mínimos (LSD) com o pacote emmeans (função emmeans).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I

As Tabelas 7 e 8 mostram os resultados do experimento I, conduzido em vasos. No estádio fenológico V_4, observou-se interação entre os dias de armazenamento e os produtos comerciais para a variável número de nódulos. Já para a massa de matéria seca de nódulo não houve interação entre os fatores. Porém, ocorreu diferenças significativas entre os tratamentos de sementes e os períodos de armazenamento analisados separadamente. No estádio fenológico V_7, não houve interação entre os fatores para nenhuma das variáveis analisadas. Contudo, houve diferenças entre os tratamentos industriais de sementes utilizados para a massa de matéria seca de planta.

O número de nódulos em V_4, no armazenamento de 0 dias, não foi influenciado pelos diferentes tratamentos de sementes; enquanto que no armazenamento de 30 dias, o tratamento controle obteve significativamente maior número de nódulos que o tratamento com carbendazim + tiram (PC_3).

Na massa de matéria seca de nódulos no estádio V_4, o tratamento com piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil (PC_1) foi significativamente superior aos demais. Comparando-se o tempo de armazenamento, 0 dias apresentou resultado significativamente superior ao tratamento de 30 dias de armazenamento.

A massa de matéria seca de planta não foi afetada pelos fatores estudados no estádio fenológico V_4. Entretanto, no estádio fenológico V_7, observou-se que fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M (PC_2) proporcionou uma massa de matéria seca de planta significativamente superior ao tratamento controle sem produtos comerciais no tratamento de sementes (PC_0).

Para a concentração de ureídeos e eficiência da FBN, não houve interação ou diferença entre os fatores tratamento de sementes e armazenamento.

Tabela 7. Número de nódulos por planta (nódulos planta-1), massa de nódulos (mg planta^{-1}), massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta^{-1}), concentração de ureídeos (mM g^{-1}) e eficiência da FBN (%), do experimento I, em vaso, com plantas no estádio fenológico V_4.

Número de nódulos[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	7aA	5aA	**6^{ns}**
PC_1	12aA	3abA	**7,5**
PC_2	6aA	3abA	**4,5**
PC_3	5aA	1bA	**3**
STD = 3,94	**7,5^{ns}**	**3**	
Massa de nódulos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,0043	0,0033	**0,0038b**
PC_1	0,0132	0,0053	**0,0093^{a}**
PC_2	0,0065	0,0017	**0,0041b**
PC_3	0,0049	0,0023	**0,0036b**
STD = 0,0047	**0,0072^{a}**	**0,0031b**	
Massa de matéria seca de parte aérea de planta[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,451	0,453	**0,452^{ns}**
PC_1	0,499	0,543	**0,521**
PC_2	0,475	0,510	**0,492**
PC_3	0,447	0,449	**0,448**
STD = 0,08	**0,468^{ns}**	**0,488**	
Concentração de ureídeos[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,280	0,280	**0,280^{ns}**
PC_1	0,140	0,180	**0,160**
PC_2	0,330	0,180	**0,250**
PC_3	0,150	0,270	**0,210**
STD = 0,14	**0,220^{ns}**	**0,230**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[5]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	3,8	3,0	**3,4^{ns}**
PC_1	4,8	4,0	**4,4**
PC_2	4,1	3,0	**3,6**
PC_3	3,1	3,7	**3,4**
STD = 1,43	**4,0^{ns}**	**3,4**	

[1]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2]Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[5] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[*] Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
[ns] Diferença estatisticamente não significativa.
[¤]STD: desvio padrão da amostra.

Tabela 8. Número de nódulos por planta (nódulos planta^{-1}), massa de nódulos (mg planta^{-1}), massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta^{-1}), concentração de ureídeos (mM g^{-1}) e eficiência da FBN (%), do experimento I, em vaso, com plantas no estádio fenológico V_7.

Número de nódulos[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	17	11	**14^{ns}**
PC_1	12	12	**12**
PC_2	18	13	**16**
PC_3	17	19	**18**
STD = 7,28	**16^{ns}**	**14**	
Massa de nódulos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,069	0,060	**0,064^{ns}**
PC_1	0,062	0,129	**0,096**
PC_2	0,511	0,140	**0,326**
PC_3	0,106	0,092	**0,099**
STD = 0,07	**0,187^{ns}**	**0,105**	
Massa de matéria seca de parte aérea de planta[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	1,22	1,26	**1,24b**
PC_1	1,30	1,71	**1,51ab**
PC_2	2,17	1,79	**1,98a**
PC_3	1,62	1,57	**1,60ab**
STD = 0,55	**1,58^{ns}**	**1,58**	
Concentração de ureídeos[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,54	0,35	**0,44^{ns}**
PC_1	0,33	0,42	**0,38**
PC_2	0,51	0,14	**0,33**
PC_3	0,34	0,39	**0,37**
STD = 0,32	**0,43^{ns}**	**0,32**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[5]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	21,5	23,0	**22,2^{ns}**
PC_1	20,4	25,8	**23,1**
PC_2	28,1	15,1	**21,6**
PC_3	26,8	30,1	**28,4**
STD = 17,74	**24,2^{ns}**	**23,5**	

[1]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2]Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[5] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
*valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
ns Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

4.2. Experimento II em campo, Nitossolo e irrigação via pivô central

No Experimento II (em campo), solo Nitossolo sob irrigação via pivô central, a massa de matéria seca de parte aérea não apresentou interação ou diferença entre o tempo de armazenamento e os tratamentos de sementes no estádio fenológico V_4 (Tabela 9). Já para o estádio fenológico R_3, houve interação entre os fatores, em função da redução significativa de 0 para 30 dias de armazenamento, nos tratamentos com piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil (Tabela 10).

Quanto aos resultados para concentração de ureídeos por estádio, houve interação entre os fatores apenas para o estádio fenológico V_4 (Tabela 9). No armazenamento de 0 dias, o tratamento controle (PC_0) proporcionou uma concentração de ureídeos significativamente superior ao tratamento com fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M. Ademais, exclusivamente para o tratamento controle (PC_0), houve uma redução na concentração de ureídeos de 0 para 30 dias de armazenamento.

De maneira similar à concentração de ureídeos, a eficiência da FBN apresentou diferenças significativas apenas no estádio fenológico V_4 (Tabela 9). Nesse caso, o armazenamento de 0 dias apresentou eficiência significativamente maior que 30 dias.

A atividade da enzima nitrogenase também apresentou diferenças exclusivamente no estádio fenológico V_4. Nesse caso, observou-se que o tratamento com carbendazim + tiram (PC_3) teve uma redução significativa na atividade da nitrogenase de 0 para 30 dias de armazenamento de sementes inoculadas. A atividade da enzima nitrogenase não demostrou diferenças estatísticas entre os tratamentos de sementes. Curiosamente, o tratamento controle, sem o uso de produtos comerciais no tratamento de sementes (PC_0), apresentou uma redução na atividade da nitrogenase de 0 para 30 dias de armazenamento (Tabela 9).

Tabela 9. Massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta-1), concentração de ureídeos (mM g^{-1}), eficiência da FBN (%) e atividade da nitrogenase (log10 [µmol g^{-1} s^{-1}]), experimento II, em Argissolo sob irrigação via pivô central, com plantas no estádio fenológico V_4.

Massa de matéria seca de parte aérea de planta[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	1,00	0,95	**0,97^{ns}**
PC_1	1,03	0,95	**0,99**
PC_2	0,85	0,84	**0,84**
PC_3	0,85	1,00	**0,92**
STD=0,15	**0,93^{ns}**	**0,93**	
Concentração de ureídeos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	4,43aA	3,20aB	**3,81^{ns}**
PC_1	4,17abA	3,86aA	**4,01**
PC_2	3,42bA	3,76aA	**3,59**
PC_3	3,78abA	4,08aA	**3,93**
STD=0,68	**3,95^{ns}**	**3,73**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	83,2	75,0	**79,1^{ns}**
PC_1	80,2	78,6	**79,4**
PC_2	76,3	75,4	**75,9**
PC_3	80,8	79,5	**80,1**
STD=5,21	**80,1^{a}**	**77,1B**	
Atividade da enzima nitrogenase[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	1,10aB	1,23aA	**1,17^{ns}**
PC_1	1,14aA	1,11aA	**1,13**
PC_2	1,27aA	1,00aB	**1,14**
PC_3	1,15aA	1,10aA	**1,13**
STD=0,16	**1,16^{ns}**	**1,11**	

[1] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2] Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
*valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
ns Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

Tabela 10. Massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta^{-1}), concentração de ureídeos (mM g^{-1}), eficiência da FBN (%) e atividade da Nitrogenase (log10 [µmol g^{-1} s^{-1}]), Experimento II, em Argissolo com irrigação via pivô central, com plantas no estádio fenológico R_3.

Massa de matéria seca de parte aérea de planta[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	33,35aA	32,35aA	**32,85^{ns}**
PC_1	34,99[a]	29,12aB	**32,06**
PC_2	32,12aA	30,34aA	**31,23**
PC_3	29,56aA	36,84aA	**33,20**
STD=5,16	**32,51^{ns}**	**32,16**	
Concentração de ureídeos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	3,17	2,95	**3,06^{ns}**
PC_1	3,42	3,56	**3,49**
PC_2	3,21	3,14	**3,18**
PC_3	3,10	3,09	**3,09**
STD = 0,65	**3,22^{ns}**	**3,19**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	66,1	55,8	**61,0^{ns}**
PC_1	60,9	62,5	**61,7**
PC_2	53,3	50,3	**51,8**
PC_3	57,8	51,7	**54,7**
STD = 12,42	**59,5^{ns}**	**55,1**	
Atividade da enzima nitrogenase[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	2,54	2,66	**2,60^{ns}**
PC_1	2,87	2,75	**2,81**
PC_2	2,90	2,92	**2,91**
PC_3	3,01	2,67	**2,84**
STD=0,28	**2,83^{ns}**	**2,75**	

[1]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2]Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
*valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
[ns] Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

A produtividade média do experimento II foi de 3877,7 kg ha^{-1}, variando entre 3641,3 e 4106,6 kg ha^{-1}. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os fatores, assim como interação entre eles. Para a massa de mil sementes, houve diferença significativa apenas para o fator armazenamento. Nesse caso, os tratamentos inoculados no dia da semeadura apresentaram massa de sementes significativamente superior àqueles inoculados e armazenados por 30 dias (Tabela 11).

Tabela 11. Produtividade (kg ha^{-1}) e massa de mil sementes (g), experimento II, em solo Argissolo sob irrigação via pivô central.

	Produtividade[1]		
	0 dias	30 dias	
PC_0	3963,5	3807,8	**3885,7^{ns}**
PC_1	3889,4	4043,0	**3966,2**
PC_2	4106,6	3665,1	**3885,8**
PC_3	3904,8	3641,3	**3773,0**
STD=544,6	**3966,1^{ns}**	**3789,3**	
	Massa de mil grãos[2]		
	0 dias	30 dias	
PC_0	215,9	217,2	**216,6^{ns}**
PC_1	237,3	216,9	**227,1**
PC_2	216,5	209,6	**213,1**
PC_3	227,3	206,0	**216,7**
STD=13,8	**224,2^{a}**	**212,4b**	

[1]Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2]Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
* Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
ns Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

4.3. Experimento III em campo, Argissolo e sem irrigação

A massa de matéria seca de parte aérea (Tabelas 12 e 13) apresentou interação entre os fatores estudados apenas no estádio fenológico V_4, mas não em R_3. No armazenamento de 0 dias não houve diferença entre os produtos comerciais usados no tratamento de sementes, enquanto no armazenamento de 30 dias o tratamento sem produto comercial apresentou massa de matéria seca de parte aérea de planta significativamente superior à fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M (PC_2). Na comparação de cada produto nos períodos de armazenamentos, apenas PC_2 apresentou redução de 0 para 30 dias.

Para as análises de concentração de ureídeos, não houve interações ou diferenças entre os fatores tempo de armazenamento e tratamento de sementes, tanto em V_4 como R_3. Já para a eficiência da FBN, houve diferença apenas no estádio fenológico R_3, onde o controle com apenas inoculante (PC_0) e fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M (PC_2) foram significativamente superiores que carbendazim + tiram (PC_3).

Quanto à atividade da nitrogenase, houve interação ou diferença entre os fatores de estudo apenas em V_4, mas não em R_3. Nesse caso, aos 0 dias de armazenamento, o controle com apenas inoculante (PC_0) foi superior ao tratamento com piraclostrobina + tiofanato-metílico +fipronil (PC_1) e carbendazim + tiram (PC_3), enquanto que aos 30 dias não houve diferença entre os tratamentos de sementes. Ainda, curiosamente, a atividade da nitrogenase foi superior em carbendazim + tiram (PC_3) aos 30 dias que aos 0 dias.

Tabela 12. Massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta^{-1}), concentração de ureídeos (mM.g^{-1}), eficiência da FBN (%) e atividade da Nitrogenase (log10 [µmol g^{-1} s^{-1}]), Experimento III, com plantas no estádio fenológico V_4.

Massa de matéria seca de parte aérea de planta[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,40aA	0,47aA	**0,44^{ns}**
PC_1	0,35aA	0,37abA	**0,36**
PC_2	0,48aA	0,32bB	**0,40**
PC_3	0,35aA	0,40abA	**0,37**
STD=0,08	**0,39^{ns}**	**0,39**	
Concentração de ureídeos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	0,75	1,03	**0,89^{ns}**
PC_1	1,09	1,00	**1,05**
PC_2	1,06	0,74	**0,90**
PC_3	1,33	1,11	**1,22**
STD=0,40	**1,06^{ns}**	**0,97**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	40,33	49,84	**45,08^{ns}**
PC_1	43,13	40,63	**41,88**
PC_2	42,70	36,92	**39,81**
PC_3	36,05	39,21	**37,63**
STD=9,95	**40,55^{ns}**	**41,65**	
Atividade da enzima nitrogenase[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	2,54aA	2,02aA	**2,28^{ns}**
PC_1	1,70bA	1,64aA	**1,67**
PC_2	1,96abA	1,85aA	**1,91**
PC_3	1,53bB	2,06aA	**1,80**
STD=0,44	**1,93^{ns}**	**1,89**	

[1] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2] Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
* Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
ns Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

Tabela 13. Massa de matéria seca de parte aérea por planta (g planta^{-1}), concentração de ureídeos (mM g^{-1}), eficiência da FBN (%) e atividade da nitrogenase (log10 [µmol g^{-1} s^{-1}]), Experimento III, com plantas no estádio fenológico R_3.

Massa de matéria seca de parte aérea de planta[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	20,18	19,90	**20,04^{ns}**
PC_1	20,61	19,16	**19,88**
PC_2	21,69	18,48	**20,08**
PC_3	18,80	24,48	**21,64**
STD=4,22	**20,32^{ns}**	**20,50**	
Concentração de ureídeos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	3,83	3,75	**3,79^{ns}**
PC_1	3,70	3,53	**3,61**
PC_2	3,41	3,47	**3,44**
PC_3	3,16	3,63	**3,39**
STD = 0,45	**3,52^{ns}**	**3,59**	
Eficiência da FBN (ureídeos/(ureídeos+nitrato))[3]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	77,39	77,20	**77,29^{a}**
PC_1	72,74	72,89	**72,82ab**
PC_2	76,25	76,06	**76,15^{a}**
PC_3	58,01	69,52	**63,76b**
STD= 9,30	**71,10^{ns}**	**73,92**	
Atividade da enzima nitrogenase[4]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	2,50	2,29	**2,45^{ns}**
PC_1	2,53	2,48	**2,50**
PC_2	2,58	2,42	**2,39**
PC_3	2,19	2,38	**2,35**
STD=0,35	**2,45^{ns}**	**2,39**	

[1] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2] Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[3] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[4] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
* Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
ns Diferença estatisticamente não significativa.
¤STD: desvio padrão da amostra.

A produtividade média do experimento III foi de 3394,9 kg ha^{-1}, variando entre 2557,9 e 3721,5 kg ha^{-1}. Houve interação significativa entre os o tratamento de sementes e o armazenamento de sementes inoculadas. No armazenamento de 0 dias não ocorreu diferenças entre os produtos utilizados no tratamento de semente em comparação com o tratamento controle (PC_0). Já no armazenamento de 30 dias, piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil (PC_1) foi superior ao tratamento com fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M (PC_2). Para a variável massa de mil grãos não houve interação ou diferenças entre os parâmetros estudados.

Tabela 14. Produtividade (kg ha^{-1}) e massa de mil sementes (g) do experimento III.

Produtividade[1]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	3439,0aA	3505,2abA	**3472,1^{ns}**
PC_1	3514,3aB	3721,5aA	**3617,9**
PC_2	3628,4aA	2557,9bB	**2890,9**
PC_3	3373,0aA	3419,6abA	**3396,3**
STD=578,47	**3488,7^{ns}**	**3199,9**	
Massa de mil grãos[2]			
	0 dias	30 dias	
PC_0	221,0	221,5	**221,2^{ns}**
PC_1	228,9	230,4	**229,7**
PC_2	227,2	221,0	**224,1**
PC_3	223,8	227,6	**225,7**
STD=8,08	**225,2^{ns}**	**225,1**	

[1] Produto comercial (p>0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[2] Produto comercial (p<0,1); Armazenamento (p>0,1); Interação (p>0,1).
[*] Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 10% de probabilidade; números em negrito representam a média de cada tratamento dentro do fator.
[ns] Diferença estatisticamente não significativa.
[¤]STD: desvio padrão da amostra.

5. DISCUSSÃO

Tanto o experimento em vaso como os experimentos em campo evidenciaram o efeito dos tratamentos de sementes e/ou período de armazenamento de sementes inoculadas.

Anghinoni et al. (2017), trabalhando com duas combinações diferentes de produtos e tempos de armazenamento, encontraram resultados semelhantes aos observados no experimento de vaso, onde o tratamento de sementes com carbendazim e tiram, isolados ou em mistura, promoveu a redução do número de nódulos na cultura da soja, e consequentemente o teor de nitrogênio nas sementes. Costa et al. (2006) avaliaram o uso de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas Carbendazim + tiram e verificaram uma redução no número de nódulos de 48% em plantas de soja, em comparação com as plantas apenas inoculadas.

Os resultados em V_4 nos experimentos de campo apresentaram padrões diferentes de resposta para as variáveis avaliadas. Para a massa de matéria seca de parte aérea de plantas, houve diferença entre os tratamentos apenas para o experimento em Argissolo, sem irrigação. Zilli et al. (2009) observaram em seu trabalho que sementes tratadas com carbendazim + tiram, e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*, não observou redução significativa na massa de matéria seca de plantas mesmo quando houve redução no número de nódulos. Também Araujo et al. (2017), utilizando piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil e armazenamento de sementes inoculadas, não encontraram diferenças significativas para a variável massa de matéria seca de plantas entre 30 e 50 dias após a emergência. O resultado observado para o experimento em sequeiro pode ter sido influenciado pelo fato do baixo volume de chuvas no início do desenvolvimento da cultura, o que pode ter levado à intensificação do efeito dos tratamentos de sementes e período de armazenamento. No entanto, o efeito na concentração de ureídeos e eficiência da FBN no início do desenvolvimento da cultura ocorreu no experimento em Nitossolo sob irrigação via pivô central.

A atividade da enzima nitrogenase também pode ter sido influenciado pela baixa quantidade de chuvas no início do desenvolvimento da cultura no experimento em sequeiro, uma vez que diferenças para essa variável não foram verificadas no experimento sob irrigação via pivô central. Segundo Bikrol et al. (2005), a atividade da nitrogenase foi afetada pelo tratamento de sementes com tiram, ocorrendo um declínio acentuado da atividade da nitrogenase.

As produtividades médias dos experimentos II e III foram de 3877,7 e 3394,9 kg ha^{-1}, respectivamente, ambas acima da média nacional na safra 2018/19 que foi de 3206,0 kg ha^{-1} (CONAB, 2019).

O armazenamento de sementes inoculadas por 30 dias pode ser prejudicial à FBN mesmo sem a presença de tratamento de sementes, conforme verificado para concentração de ureídeos em V_4 no experimento II.

O número de nódulos em V_4 no experimento em vaso apontou uma redução na variável aos 30 dias de armazenamento em função do tratamento com carbendazim + tiram. O efeito adverso de carbendazim e tiram, isolados ou em mistura, na FBN foi reportado em outros estudos (BIKROL; SAXENA; SINGH, 2005; CAMPO; ARAÚJO; HUNGRIA, 2009; MARTYNIUK; KOZIEL; GALAZKA, 2016; ANGHINONI et al., 2017). Ademais, outros ingredientes ativos dos mesmos grupos químicos (benzimidazois e ditiocarbamatos) foram relatados como prejudiciais à nodulação, afetando número e massa de nódulos (CAMPO; ARAÚJO; HUNGRIA, 2009). Fungicidas do grupo ditiocarbamatos têm ação multissítio e afetam processos bioquímicos de diversos organismos. Contudo, apesar da combinação carbendazim + tiram (PC_3) ter sido inferior ao controle para número, o mesmo não ocorreu na avaliação de concentração de ureídeos e eficiência da FBN.

Comparando-se as produtividades dos tratamentos de semente (PC_0, PC_1, PC_2 e PC_3) aos 0 e 30 dias de armazenamento, pode-se observar que os tratamentos com presença de fungicidas foram iguais ou inferiores ao tratamento com apenas inoculante (pstc0). Apesar de ser uma excelente estratégia de manejo para diversas doenças (DORRANCE; MCCLURE, 2001; URREA, RUPE, ROTHROCK, 2013), a relação entre custo e benefício do uso de tratamento de sementes em soja é um tema de crescente discussão safra após safra, justamente por apresentar uma variação muito grande em resultados positivos para produtividade (BRADLEY, 2008). Rossman et al. (2018), testando combinações de fungicidas, fungicidas + inseticidas, e inseticidas + fungicidas + nematicidas ao longo de duas safras em sete ambientes diferentes observaram que tanto fungicidas, como fungicidas + inseticidas e fungicidas + inseticidas + nematicidas aumentaram o estande de plantas em V_C/V_1, quando comparados ao controle sem nenhum tratamento de sementes. No entanto, apenas fungicida + inseticida apresentou um aumento em produtividade. Os autores ainda demonstram que, apesar de produtividade ser correlacionada com estande de plantas ($r=0,16$, $p=<0,0001$), o aumento no estande de plantas resultou em aumento de produtividade em apenas um local e apenas na safra de 2015, quando a população de plantas do tratamento controle caiu abaixo de 247.000 plantas por hectare. Esse estudo não mostrou ganho estatístico em produtividade comparando-se tratamento de sementes com e sem fungicidas em todos os 24 ambientes de produção estudados (8 locais x 3 anos).

A produtividade é o fator determinante na tomada de decisão para experimentos de campo, uma vez que representa o produto final de todos os fatores que interagiram com a cultura

ao longo do seu desenvolvimento no campo. Não obstante, é frequente o relatado por outros autores que trabalham com variáveis relacionadas à FBN na soja a falta de responsividade da produtividade em função da FBN. O número de nódulos e a produtividade são medidas complementares em estudos sobre a FBN. Por exemplo, Sanginga et al. (2000) observaram que o uso de inoculante influenciou a nodulação em soja, mas não a produtividade. Já no Brasil, Hungria et al. (1998) observaram que o uso de inoculante influenciou a produtividade, mas não afetou os parâmetros de nodulação. Hungria et al. (2017) observaram que, mesmo em situações onde há respostas lineares no número e massa de nódulos em relação ao aumento de doses de inoculantes, pode não haver resultado para o aumento de produtividade.

Das diferenças observadas para os componentes de produção, não se observaram diferenças para produtividade e massa de mil sementes em conjunto. No experimento II, houve uma redução na massa de mil sementes devido ao armazenamento das sementes inoculadas por 30 dias, mas não houve redução de produtividade. Por outro lado, no experimento III, houve um impacto do fator armazenamento exclusivamente sobre a mistura fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M (PC_2) para a produtividade da cultura de soja. No entanto, efeito contrário do armazenamento foi observado para a mistura piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil, onde 30 dias apresentou produtividade significativamente superior a 0 dias. Araujo et al. (2017) não encontraram diferenças na produtividade comparando o uso de inoculante associado a piraclostrobina + tiofanato-metílico + fipronil (pstc1) e armazenamento de sementes tratadas e pré-inoculadas por 0 e 30 dias, em quatro experimentos realizados em solos com concentração de *Bradyrhizobium* sp. variando de 0 a 10^4 UFC g^{-1} de solo. Os autores também não observaram redução no número e massa de nódulos em plantas na fase vegetativa da cultura. Apesar de não terem encontrado diferença a campo, houve uma redução de $6{,}70 \times 10^7$ para $2{,}31 \times 10^3$ UFC $semente^{-1}$, valor este que, tecnicamente, estaria abaixo do recomendado para garantir bom desempenho simbiótico nas condições do Brasil (HUNGRIA et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Tanto o armazenamento de sementes pré-inoculadas, como o uso de produtos comerciais no tratamento de sementes influenciaram variáveis relacionadas à FBN nos três experimentos. Considerando-se os componentes de produção da cultura, o armazenamento influenciou a massa de mil grãos, enquanto os tratamentos de sementes influenciaram a produtividade apenas aos 30 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ABRASEM - Associação Brasileira de Sementes e Mudas. **Guia Abrasem de boas práticas de tratamento de sementes**. Brasília, 28p., 2014.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.

ANDRÉS, J. A.; CORREA, N. S.; ROSAS, S. B. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicumin* the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. **Biology and Fertility Soils**, v. 26, p. 141-145, 1998.

ANGHINONI, F. B. G.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ANGHINONI, G.; FERRI, G. C.; SUZUKAWA, A. K. Pre-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. in industrially treated soybean seeds. **Agricultural Sciences**, v. 8, p. 582-590, 2017.

ARAUJO, R. S.; CRUZ S. P.; SOUCHIE, E. L.; MARTIN, T. N.; NAKATANI, A. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: technological innovation for large-scale agriculture. **International Journal of Microbiology**, p. 1-11, 2017.

BALBINOT, A. A.; HIRAKURI, M. H.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; RIBEIRO, R. H. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11). Análise da área, produção e produtividade de soja no Brasil em duas décadas (1997-2016) **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa**, p. 21, 2017.

BARAL, B.; SILVA, J.; PAUDYAL, R. Biogenesis and cycling of ureides in broad bean (*Vicia faba* L.). **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 88-97, 2012.

BARAL, B.; TEIXEIRA, J. A.; GUPTA, V. N. Xylem-mediated channeling of nitrogen in broad bean (*Vicia faba*). **Environmental and Experimental Biology**, p. 187-197, 2014.

BARAL, B.; SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 97-109, 2016.

BARAL, B.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Purine-derived ureides under drought and salinity. **Advances in Agronomy**, p. 167-204, 2017.

BIKROL, A.; SAXENA, N.; SINGH, K. Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment**. African Journal of Biotechnology, v**. 4, n. 7, p. 667-671, 2005.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; UURQUIAGA, S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 889-895, 2001.

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

BRODERS, K. D.; LIPPS, P. E.; PAUL, P. A.; DORRANCE, A. E. Evaluation of Fusarium graminearum associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, v. 91, p. 1155-1160, 2007.

CAMPO, R. J.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009.

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

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CEPAGRI. Disponível em: < http://www.cpa.unicamp.br/outras informacoes/clima_muni_297.html>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CHEN, L. M.; ZHOU, X. A.; LI, W. B.; CHANG, W.; ZHOU, R.; WANG, C.; SHA, A. H.; SHAN, Z. H.; ZHANG, C. J.; QIU, D. Z.; YANG, Z. L.; CHEN, S. L. Genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes under dehydration and rehydration conditions. **BMC Genomics**, n. 14, p. 687, 2013.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p. 833-840, 2003.

CHUNGOPAST, S.; THAPANAPONGWORAKUL, P.; MATSUURA, H.; VAN DAO, T.; ASAHI, T.; TADA, K. Glutamine synthetase I-deficiency in *Mesorhizobium loti* differentially affects nodule development and activity in *Lotus japonicus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 104-108, 2014.

CIAMPITTI, I. A.; SALVAGIOTTI, F. Soybeans and biological nitrogen fixation: a review. **Better Crops**, v. 102, n. 3, 2018.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Boletim Agronegócio Internacional. 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 15 ago. 2019.

COSTA, M. R.; KAWSKI, N. L.; GIL, F. K. U.; GOULART, A. C. P.; MERCANTE, F. M. Aplicação de fungicidas em sementes de soja e seus efeitos na nodulação e fixação biológica de nitrogênio. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 27.; Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 11.; Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 9.; Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 6., 2006, Bonito, MS. A busca das raízes: anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).

DIGHE, N. S.; SHUKLA, D.; KALKOTWAR, R. S.; LAWARE, R. B.; BHAWAR, S. B.; GAIKWAD, R. W. Nitrogenase Enzyme: a review. **Der Pharmacia Sinica**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

DORRANCE, A. E.; MCCLURE, S. A. Beneficial effects of fungicide seed treatments for soybean cultivars with partial resistance to *Phytophthora sojae*. **Plant Disease**, V. 85, p. 1063-1068, 2001.

DORRANCE, A. E.; KLEINHENZ, M. D.; MCCLURE, S. A.; TUTTLE, N. T. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean**. Plant Disease**, v. 87, p. 533- 538, 2003.

DORRANCE, A. E.; ROBERTSON, A. E.; CIANZO, S.; GIESLER, L. J.; GRAU, C. R.; DRAPER, M. A., TENUTA, A. U.; ANDERSON, T. R. Integrated management strategies for *Phytophthora sojae* combining host resistance and seed treatments. **Plant Disease**, v.93, p. 875-882, 2009.

DUNN, M. F. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-41, 2015.

EHRHARDT, D. W.; WAIS, R.; LONG, S. R. Calcium spiking in plant root hairs responding to rhizobium modulation signals. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 673-681, 1996.

ELLIS, M.L.; BRODERS, K.D.; PAUL, P.A.; DORRANCE, A.E. Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. **Plant Disease**, v. 95, p. 401-407, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: < https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>. Acesso em: 10 mai. 2019.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLIL, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; JONG VAN LIER, Q. ; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - Revisão. **Revista da Faculdade de Zooctenia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Soja. In: MONTEIRO, J. E. B. A. (Ed.). Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola. **Instituto Nacional de Meteorologia**, p. 263-277, 2009.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, F. A.; LOURINI, I. Adoção do tratamento industrial de sementes de soja no Brasil, safra 2014/15**.** **Informativo Abrates**, v. 25, p. 26-29, 2015.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes com fungicidas: uma prática de baixo custo que previne grandes prejuízos. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 135, p. 22-25, 2010.

HENNING, A. A.; FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LORINI, I. Importância do tratamento de sementes de soja com fungicidas na safra 2010/2011, ano de "La Niña". **Informativo Abrates**, v. 20, n. 1-2, p. 55-61, 2010.

HENNING, A. A. Tratamento industrial de sementes mais prático e eficiente. **Revista campo e negócio**, v. 4, n. 115, 2012.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n.4, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica de nitrogênio. **Embrapa Soja. Circular Técnica**, v. 35, p. 1-48, 2001.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH R. P.; SHANKAR N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Studium Press/LCC, p. 43-93, 2006.

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

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; SILVA JÚNIOR, E. B.; ZILLI, J. E. Inoculum Rate Effects on the Soybean Symbiosis in New or Old Fields under Tropical Conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, p. 1-7, 2017.

IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; LAZAROVITS, G.; BARAL, B. Ureide metabolism in plant-associated bacteria: purine plant-bacteria interactive scenarios under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, p. 1-34, 2018.

KECSKES, M.; VINCENT, J. The effect of some fungicides on *Rhizobium leguminosarum*. **Int Lab Invest Agrokem Talajt**, v. 18, p. 57-70, 1969.

LARRAINZAR, E.; RIELY, B. K.; KIM, S. C.; CARRASQUILLA-GARCIA, N.; YU, H. J.; HWANG, H. J.; OH, M.; KIM, G. B.; SURENDRARAO, A. K.; CHASMAN, D.; SIAHPIRANI, A. F.; PENMETSA, R. V.; LEE, G. S.; KIM, N.; ROY, S.; MUN, J. H.; COOK, D. R. Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals**. Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 233-265, 2015.

LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H. The cytosolic glutamine synthetase GLN1; 2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis rosettes* when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1375-1390, 2011.

LUDWIG, M. P. Tratamentos de sementes: profissionalização. **Revista Seed News**, v. 11, n. 4, p.10-12. 2017.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NACAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 4ª ed. Funep. Jaboticabal. p. 522-588, 2000.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 5 mai. 2019.

MARTYNIUK, S.; KOZIEL, M.; GALAZKA, A. Survival of rhizobia on seeds, nodulation and growth of soybean as influenced by synthetic and natural seed-applied fungicides. **Polish Journal of Agronomy**, v. 27, p. 96-99, 2016.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T., SUHET, A. R. Embrapa Cerrados: 37 anos de contribuição para o avanço de FBN no Brasil. In: Anais de KVI RELARE - Reunião da rede de laboratórios para a recomendação, padronização e difusão de tecnologias de inoculantes microbianos de interesse agrícola. Londrina: Embrapa Soja, p. 60-61, 2014. (Embrapa Soja. Documentos, 350).

MINAMI, E.; KOUCHI, H.; COHN, J. R.; OGAWA, T.; STACEY, G. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. **Plant Journal**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 1996.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. de M.; BAZO, G. L.; LIMA, L. H. da S. Influência do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas. **Ambiência**, v. 9, n. 2, p. 289-298, 2013.

REES, D. C.; AKIF TEZCAN, F.; HAYNES, C. A.; WALTON, M. Y.; ANDRADE, S.; EINSLE, O.; HOWARD, J. B. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 363, n. 1829, p. 971-984, 2005.

RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 147-162, 2002.

RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Characterization of soybean cultivars genetically improved for human consumption. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, p. 1-7, 2015.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; THOMPSON, H.E.; BENSON, G.O. How a soybean plant develops. **Ames: Iowa State University of Science and Technology** (Special Report 53). 20p. 1977.

ROSSMAN, D. R.; BYRNE, A. M.; CHILVERS, M. I. Profitability and efficacy of soybean seed treatment in Michigan. **Crop Protection**, v. 14, p. 44–52, 2018.

SADOWSKY, M. J.; GRAHAM, P. H.; SUGAWARA, M. Root and stem nodule bacteria of legumes. In: **The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations**. p. 401-425, 2013.

SADOWSKY, M. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**, v. 4. Springer, Dordrecht, p. 89-112, 2005.

SALVAGIOTTI, F.; CASSMAN, K. G.; SPECHT, J. E.; WALTERS, D. T.; WEISS, A.; DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review**. Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.

SANGINGA, N.; THOTTAPPILLY, G.; & DASHIELL, K. Effectiveness of rhizobia nodulating recent promiscuous soyabean selections in the moist savanna of Nigeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p., 127–133, 2000.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos de soja**, 2009.

SILSBURY, J. H. Energy requirement for symbiotic nitrogen fixation. **Nature**, v. 267, p. 149-150, 1977.

SILVA, K.; SILVA, E. E.; FARIAS, E. N. C.; CHAVES, J. S.; ALBUQUERQUE, C. N. B.; CARDOSO, C. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* preinoculation in association with chemical treatment of soybean seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 14, p. 726-732, 2018.

STACEY, G.; LIBAULT, M.; BRECHENMACHER, L.; WAN, J.; MAY, G. D. Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 110-121, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal e diversidade vegetal**. Ed. Porto Alegre, v. 6, p. 693, 2017.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de Sementes. **Informe Agropecuário**, n. 11, p. 76-87, 1985.

TEIXEIRA, W. F.; FAGAN, E. B.; SOARES, L. H.; SOARES, J. N.; REICHARDT, K.; NETO, D. D. Seed and Foliar Application of Amino Acids Improve Variables of Nitrogen Metabolism and Productivity in Soybean Crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 396, 2018.

UDVARDI, M.; POOLE, P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 781-805, 2013.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2/3, p. 211-228, 2000.

URREA, K.; RUPE, J.C.; ROTHROCK, C.S. Effect of fungicide seed treatments, cultivars, and soils on soybean stand establishment. **Plant Disease**, v. 97, p. 807-812, 2013.

VANCE, C. P. Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKATI, U. (Ed.). **Plant Roots**. The Hidden Half. 3. ed. p. 839-867, 2002.

YANG, W. C.; BISSELING, T. Molecular aspects of legume root nodule organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 209-238, 1995.

YOUNG, E. G.; CONWAY, C. F. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 142, p. 839-853, 1942.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 968-989, 1999.

ZILLI, J. E.; RIBEIRO, K. G.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 917-923, 2009.

ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, J. R. C.; HUNGRIA, M. Inoculação de soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1875-1881, 2010.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 87-93, 2015.