

Enraizadores no tratamento de sementes de soja

Eduardo dos Santos Schmoller^{1*}; Norma Schlickmann Lazaretti¹

¹Curso de Agronomia, Centro Universitário Assis Gurgacz (FAG), Cascavel, Paraná.

^{1*}edusantos.schmoller@outlook.com

RESUMO: A elevada produtividade da cultura da soja decorre principalmente dos avanços relacionados a práticas de manejo do solo, desenvolvimento e aprimoramento de novos insumos, dentre outros fatores. Bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento de plantas apresentam elevada afinidade com culturas oleaginosas. A utilização de bioestimulantes, normalmente destinados a culturas frutíferas, podem beneficiar essas relações planta/bactéria, elevando a área de contato entre os dois organismos. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento bioestimulantes comerciais no tratamento de sementes, avaliando seu efeito na germinação e desenvolvimento inicial da soja. O delineamento experimental adotado foi o de Fatorial em DBC, contando com quatro tratamentos, T1 – controle; T2 - P₂O₅ (12,4%), Mo (10,0%), Co (1,0%); T3 - K₂O (5,0%), Zn (2,0%), S (1,0%), N (1,0%), Mn (1,0%), Fe (0,4%), B (0,08%, e T4 - P₂O₅ (12,4%), Mo (2,0%), Zn (4,0%), dispersos em oito blocos com quatro vasos por bloco, totalizando 32 unidades amostrais. O experimento foi conduzido na estufa de germinação da Unidade de Beneficiamento de Sementes da Coopavel, em estufa de aproximadamente 150 m² com sistema de irrigação automático e proteção lateral (telas de sombreamento). Os parâmetros avaliados foram o índice de velocidade de emergência, tamanho de plantas aos sete e vinte e oito dias após a semeadura, massa fresca e seca de raízes e parte aérea das plântulas. Os diferentes bioestimulantes não apresentaram influência no desenvolvimento inicial das plântulas na utilização das doses recomendadas pelos fabricantes. Diferentes cultivares de soja podem apresentar diferentes arranques iniciais. Mais estudos devem ser realizados buscando verificar se há diferença na produtividade.



Palavras-chave: Insumos; fertilizantes; culturas oleaginosas; bioestimulantes.

Roots in the treatment of soybean seeds

ABSTRACT: The high productivity of the soybean crop is mainly due to advances related to soil management practices, development and improvement of new inputs, among other factors. Nitrogen-fixing and plant growth-promoting bacteria have high affinity with oilseed crops. The use of biostimulants, normally intended for fruit crops, can benefit these plant/bacteria relations, increasing the contact area between the two organisms. Thus, this work aimed to study the behavior of commercial biostimulants plants in seed treatment, evaluating their effect on germination and initial development of soybean. The experimental design adopted was Factorial in DBC, with four treatments, T1 = control; T2 - P₂O₅ (12,4%), Mo (10,0%), Co (1,0%); T3 - K₂O (5,0%), Zn (2,0%), S (1,0%), N (1,0%), Mn (1,0%), Fe (0,4%), B (0,08%, and T4 - P₂O₅ (12,4%), Mo (2,0%), Zn (4,0%), dispersed in eight blocks with four vessels per block, totaling 32 sample units. The experiment was conducted in the germination oven of the Coopavel Seed Processing Unit, in a greenhouse of approximately 150 m² with automatic irrigation system and side protection (shading screens). The parameters evaluated were the emergence speed index, size of plants at seven and twenty-eight days after sowing, fresh and dry mass of roots and shoots of the seedlings. The different biostimulants did not influence the initial development of the seedlings using the doses recommended by the manufacturers. Different soybean cultivars can present different initial start-up. More studies should be carried out to verify if there is a difference in productivity.

Keywords: farm inputs; fertilizers; oilcrops; biostimulants.

Introdução

Ao lado dos Estados Unidos, o Brasil ocupa o topo do *ranking* como um dos principais produtores de soja (*Glycine max L.*) do mundo (DA SILVA *et al.*, 2017a). Nesse contexto, pode-se considerar a soja como a principal *commodity* agrícola derivada do mercado nacional, principalmente por sua importância como fonte de nutrição humana e animal (DEAK, 2017).

Ao se buscar meios que elevem os níveis de produtividade das culturas brasileiras, faz-se necessário o avanço científico e tecnológico, direcionando os esforços para um melhor conhecimento das exigências nutricionais de cada uma das variedades de culturas, elevando assim, a qualidade dos insumos produzidos (GONÇALVES JR. *et al.*, 2010). Dentre os principais avanços relacionados a insumos para a cultura da soja, o tratamento direto de sementes é fundamental para obtenção de uma rápida e adequada estabilização da população de plântulas que apresentam grande valor produtivo (GOULART; MELO FILHO, 2000). Nesse sentido, dá-se foco ao desenvolvimento de enraizadores de alta eficiência.

Em geral, culturas leguminosas apresentam elevada capacidade em promover relações de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. De modo especial, para a cultura da soja, a afinidade ocorre principalmente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, responsáveis pela formação de nódulos e promotoras do crescimento das plantas, respectivamente. Os enraizadores têm papel fundamental nessas bio relações, pois estimulam o crescimento das raízes e permitem maior área superficial para colonização dos microrganismos de interesse (PERIPOLLI *et al.*, 2016). Esses fatores apresentam relação direta com a elevação da produtividade da cultura (BERTICELLI e NUNES, 2008).

Apesar de muitos enraizadores comerciais (compostos por concentrações balanceadas de macro e micronutrientes) serem geralmente recomendados para plantas frutíferas, há a possibilidade e um grande avanço em pesquisas relacionadas à sua utilização em culturas anuais (SILVA *et al.*, 2019). Berticelli e Nunes (2008), realizando experimento a campo e avaliando a eficiência de um enraizador submetido a cultura do milho, observaram incremento de produção com diferenças estatísticas para as variáveis massa verde, altura de inserção da 1^a espiga, nº de grãos, nº de fileiras por espiga e produção final de grãos. Da Silva *et al.* (2017b), realizando o manejo fisiológico com tratamentos específicos para sementes de soja, obtiveram resultados satisfatórios e estatisticamente válidos para variáveis como comprimento e largura da raiz, matéria seca de caule e folhas, concluindo que as aplicações podem elevar a produtividade de grãos. Silva *et al.* (2019), estudando a qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com enraizador bioativador, observaram acréscimo nas relações entre massa seca

da parte aérea e massa seca de raiz, ao passo que o ativador não prejudicou o potencial fisiológico das sementes.

Diversos são os avanços relacionados à utilização de enraizadores nas principais culturas anuais e torna-se crescente o interesse pelo desenvolvimento de novos produtos relacionados a essa temática. O contínuo desenvolvimento de experimentos e pesquisas são fundamentais para a consolidação e validação dessas tecnologias. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de enraizadores comerciais no tratamento de sementes, avaliando seu efeito na germinação e desenvolvimento inicial da soja.

Material e Métodos

O desenvolvimento da pesquisa ocorreu no município de Cascavel-PR, sob coordenadas geográficas de Latitude: -24.9555, Longitude: -53.4552, 24° 57' 20" Sul, 53° 27' 19" Oeste e altitude de 757 metros. O experimento foi conduzido na estufa de germinação da Unidade de Beneficiamento de Sementes Coopavel, a estufa é de aproximadamente 150 m² que conta com sistema de irrigação por aspersão automático e proteção lateral (telas de sombreamento).

O delineamento experimental adotado para o desenvolvimento da presente pesquisa foi o de Fatorial em DBC.

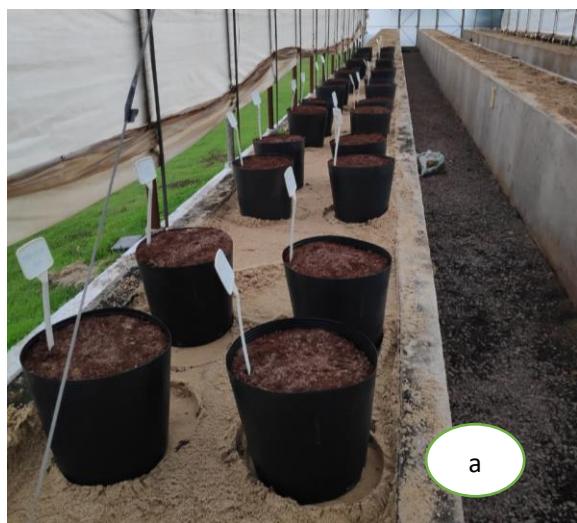
No experimento foram utilizadas sementes de soja da variedade 55I57 RSF IPRO (ZEUS) e 58I60 RSF IPRO (LANÇA). Foram testados três fertilizantes/enraizadores comerciais, apresentando as seguintes composições em nutrientes, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos. Cascavel – PR, 2020.

Tratamentos	Composição (Nutrientes e Percentual)
T1	Controle
T2	P ₂ O ₅ (12,4%); Mo(10,0%); Co (1,0%)
T3	K ₂ O(5,0%); Zn (2,0%); S (1,0%); N(1,0%); Mn (1,0%); Fe(0,4%); B(0,08%)
T4	P ₂ O ₅ (12,4%); Mo(2,0%); Zn (4,0%)

Estes foram dispersos em 8 blocos com 4 vasos por bloco, totalizando 32 unidades amostrais. As doses de aplicação de cada um dos fertilizantes foram realizadas conforme recomendações dos fabricantes, foi adicionado apenas um tratamento de semente em todas as amostras com inseticida e fungicida para prevenção e controle de eventuais pragas e doenças de solo.

Imagen – Disposição espacial dos tratamentos em casa de vegetação, no plantio (a); e com 12 dias após emergência (b).



Foram avaliadas as seguintes varáveis: índice de velocidade de emergência, tamanho de plantas aos sete e vinte e oito dias após a semeadura, massa fresca e seca de raízes e parte aérea das plântulas.

O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado através de avaliações diárias do número de plântulas emergidas, até a estabilização no nono dia após a semeadura, conforme Maguire (1962). $IVG = N_1/D_1 + N_2/D_2 + \dots + N_n/D_n$. Onde: IVG = índice de velocidade de emergência; N = números de plântulas verificadas no dia da contagem; D = números de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

O tamanho das plantas foi obtido por meio da medida da distância entre o coletor da planta e o ápice das folhas no vigésimo oitavo dia após a semeadura com o auxílio de uma trena e os resultados expressos em centímetros.

Após o arranque das plântulas dos vasos, elas foram lavadas em água corrente e posteriormente foram pesadas para determinar a massa fresca. A massa seca das plantas foi obtida após secagem das mesmas em estufa com circulação de ar forçado, na temperatura de 60°C, essas plantas permaneceram em estufa até atingirem peso constante. Os resultados foram expressos em gramas por planta obtido pela pesagem em balança com duas casas decimais.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

Resultados e Discussão

Os resultados do presente trabalho estão expressos nas Tabelas 2 e 3, e através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância, observou-se diferença nas variáveis índice de velocidade de emergência, tamanho das plântulas, massa seca e massa fresca.

As comparações foram feitas com base no CV (Coeficiente de Variação) e na DMS (Diferença Mínima Significativa) que para Lucio e Storck (1998) o CV é uma estatística utilizada com frequência pelos pesquisadores como indicador de qualidade experimental e completa que a DMS é uma estatística adequada para o controle de qualidade dos ensaios de competições de cultivares. Segundo Pimentel Gomes (2000) se o Coeficiente de Variação for abaixo de 10% são considerados de ótima precisão, de 10 a 20% são considerados médios e de boa precisão, de 20 a 30 % os dados são considerados de baixa precisão e acima de 30 muito baixa precisão.

Os resultados demonstrados na Tabela 2, mostram que as doses aplicadas não influenciaram na velocidade de emergência entre os tratamentos T1, T2, T3 e T4, de ambas as variedades, pois os resultados não atingiram a diferença mínima significativa. Já Vieira e Castro (2001), obtiveram resultados diferentes com efeito do bioestimulante sobre a germinação de sementes de soja, quando verificaram que a concentração de 3,5 mL de bioestimulante para 0,5 kg⁻¹ de sementes proporcionou o número maior de plântulas normais, com aumento de 51,9% em relação ao controle.

Quando comparado o tamanho das plântulas aos 7 dias entre as cultivares, ocorreu diferença apenas no T4, onde a cultivar Lança apresentou melhor resultado (6,73 cm) e a Zeus (5,58 cm).

Com relação à tamanho de plântulas avaliadas após 7 dias de emergência foi observado diferenças significativas estatisticamente entre os diferentes tratamentos, onde na cultivar Lança o T3 apresentou tamanho menor, sendo diferente do tratamento T4. Na cultivar Zeus houve diferenças entre os tratamentos, e o T2 apresentou o melhor tamanho, sendo diferente de todos os demais. Com relação a avaliação do tamanho das plântulas aos 28 dias não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e cultivares.

Alves (2018) relata que até 30 dias após o plantio, diferentes doses de bioestimulante não promoveram nenhuma diferença no desenvolvimento das plantas. Santos (2020) também verificou que os resultados obtidos até os 28 dias após emergência não interferem no desenvolvimento inicial, velocidade de emergência e altura de planta.

Já para Binsfeld *et al.* (2014) os tratamentos que foram submetidos ao regulador de crescimento vegetal com efeito bioestimulante influenciaram positivamente no desempenho

inicial de plântulas. Vasconcelos (2006) também relatou que os bioestimulantes podem modificar o status hormonal da planta e ter grande influência no seu crescimento e desenvolvimento.

Tabela 2 – Índice de velocidade de emergência e tamanho das plântulas aos 7 e 28 dias após a semeadura (cm) da soja em função do tratamento das sementes com diferentes fertilizantes/enraizadores comerciais. Cascavel – PR, 2021.

Tratamentos / Cultivares	Índice de Velocidade de Emergência		Tamanho das plântulas 7 DAS (cm)		Tamanho das plântulas 28 DAS (cm)	
	Lança	Zeus	Lança	Zeus	Lança	Zeus
1	1,70Aa	1,55Aa	6,10Aab	5,80Ab	20,63Aa	20,92Aa
2	1,55Aa	1,64Aa	6,21Aab	6,50Aa	21,06Aa	19,86Aa
3	1,69Aa	1,63Aa	5,87Ab	5,75Ab	20,98Aa	19,47Aa
4	1,54Aa	1,66Aa	6,73Aa	5,58Bb	21,70Aa	20,49Aa
C. V. (%)	16,9		5,62		7,35	
DMS (Linha)	0,40		0,50		2,27	
DMS (Coluna)	0,53		0,67		3,03	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferenciam estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey. DAS = Dias após a semeadura; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença mínima significativa. Tratamentos: T1 = Controle; T2 = P₂O₅ (12,4%), Mo (10,0%) e Co (1,0%); T3 = K₂O (5,0%), Zn (2,0%), S (1,0%), N (1,0%), Mn (1,0%), Fe (0,4%) e B (0,08%); T4 = P₂O₅ (12,4%), Mo (2,0%) e Zn (4,0%).

Em relação a massa fresca de raízes e parte aérea (Tabela 3) houve diferença entre as cultivares, ocorrendo diferença estatística no T3, onde a cultivar Lança apresentou melhor massa fresca da parte aérea (4,84 g) e a Zeus (3,04 g). Resultado este que condiz com o teste conduzido por Hermes, Nunes e Ditzel (2015) no qual apresentou diferença significativa, sendo a maior massa fresca encontrada no tratamento que se utilizou o bioestimulante.

Vieira (2001) relata que o uso de biorreguladores em diferentes dosagens proporcionam um aumento significativo no teor de matéria fresca e produtividade nas culturas do feijão, soja e arroz. Santos e Vieira (2005), observaram que a utilização de bioestimulantes em diferentes doses, composto por citocinina, ácido indol-butírico e ácido giberélico na cultura do algodão, quando utilizado via tratamento de semente é capaz favorecer o desenvolvimento de plântulas mais vigorosa, sendo proporcional ao aumento da dose do produto.

No que se refere a massa seca de raízes e parte aérea não houve diferença estatística entre os tratamentos nas duas cultivares. Já quando comparado os resultados das cultivares dentro do mesmo tratamento observa-se diferenças no T3 e T4, sendo que nos dois a cultivar Lança apresentou os melhores resultados, 1,02 e 1,03 g respectivamente, e na cultivar Zeus para esses tratamentos 0,69 e 0,67 g. Na massa seca da parte aérea, obteve-se diferença estatística apenas no T3, onde a cultivar Lança apresentou 1,46 g e a cultivar Zeus 1,02 g.

Tabela 3 – Massa fresca e massa seca das raízes e da parte aérea da soja em função do tratamento das sementes com diferentes fertilizantes/enraizadores comerciais. Cascavel – PR, 2021.

Tratamentos / Cultivares	Massa Fresca				Massa Seca			
	Raízes (g)		Parte Aérea (g)		Raízes (g)		Parte Aérea (g)	
	Lança	Zeus	Lança	Zeus	Lança	Zeus	Lança	Zeus
1	7,40Aa	6,71Aa	3,55Aa	4,15Aa	0,79Aa	0,78Aa	1,09Aa	1,27Aa
2	6,45Aa	6,24Aa	4,10Aa	3,77Aa	0,80Aa	0,73Aa	1,27Aa	1,10Aa
3	7,66Aa	5,71Aa	4,84Aa	3,04Ba	1,02Aa	0,69Ba	1,46Aa	1,02Ba
4	7,01Aa	6,59Aa	4,48Aa	3,16Aa	1,03Aa	0,67Ba	1,33Aa	1,04Aa
C. V. (%)	29,44		25,46		24,95		21,68	
DMS (Linha)	2,89		1,44		0,30		0,40	
DMS (Coluna)	3,86		1,93		0,40		0,51	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferenciam estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey. CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença mínima significativa. Tratamentos: T1 = Controle; T2 = P₂O₅ (12,4%), Mo (10,0%) e Co (1,0%); T3 = K₂O (5,0%), Zn (2,0%), S (1,0%), N (1,0%), Mn (1,0%), Fe (0,4%) e B (0,08%); T4 = P₂O₅ (12,4%), Mo (2,0%) e Zn (4,0%).

Segundo Santos (2009), resultado semelhante a este foi observado com a utilização de bioestimulantes, onde estes aumentaram a porcentagem de germinação de sementes, resultando em um aumento de matéria seca das raízes das plântulas de soja. Beltrame (2009) relata que todas as sementes submetidas a tratamentos com fertilizantes aumentam significativamente a altura, comprimento de raiz e massa seca de parte aérea e de raiz.

Na literatura existem vários trabalhos que mostram diferentes resultados com a utilização de fertilizantes/enraizadores no tratamento de sementes de soja, que a longo prazo promovem uma melhora no desenvolvimento das plantas e incrementam na produtividade, quando comparadas com aquelas que não foram realizadas tratamento de sementes, o que não foi obtido no presente trabalho.

Conclusões

Os diferentes fertilizantes/enraizadores não apresentaram influência no desenvolvimento inicial das plântulas na utilização das doses recomendadas pelos fabricantes.

Diferentes cultivares de soja podem apresentar diferentes arranques iniciais.

Mais estudos devem ser realizados buscando verificar se há diferença na produtividade.

Referências

ALVES, M. S. **Diferentes dosagens de bioestimulante no tratamento de sementes de soja.** Patrocínio: Centro Universitário do Cerrado Patrocínio, 2018. 24p.

BELTRAME, L. C. **Eficiência do uso de fertilizantes, fungicidas e inoculante no tratamento de sementes de soja.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

BERTICELLI, E.; NUNES, J. Avaliação da eficiência do uso de enraizador na cultura do milho. **Revista Cultivando o saber**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2008.

BINSFELD, J. A.; BARBIERI, A. P. P.; HUTH, C.; CABRERA, I. C.; HENNING, L. M. M. Uso de bioativador, bioestimulante e complexo de nutrientes em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 88-94. 2014.

DA SILVA, N. F.; CLEMENTE, G. S.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; CUNHA, F. N. Tratamento de sementes e acúmulo de fitomassa inicial na cultura da soja. **Global Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 1-13, 2017a.

DA SILVA, N. F.; CLEMENTE, G. S.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; CUNHA, F. N. Manejo fisiológico específico via tratamento de semente na fase inicial da cultura da soja. **Global Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 106-116, 2017b.

DEAK, E. A. **Temperatura e umidade do solo na co-inoculação na cultura da soja.** 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2014.

GONÇALVES JR., A. C.; NACKE, H.; MARENCONI, N. G.; DE CARVALHO, E. A.; COELHO, G. F. Produtividade e componentes de produção da soja adubada com diferentes doses de fósforo, potássio e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 660-666, 2010.

GOULART, A. C. P.; MELO FILHO, G. A. **Quanto custa tratar as sementes de soja, milho e algodão com fungicidas?** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, Boletim de Pesquisa 7, 2000.

HERMES, E. C. K.; NUNES, M. J. DITZEL, J. V. N. Influência do bioestimulante no enraizamento e produtividade da soja. **Revista Cultivando o Saber - Edição Especial**, p. 35 – 45. 2015.

LUCIO, A. D. C; STORCK, L. Relação entre Diferença Mínima Significativa e Coeficiente de Variação nos Ensaios de Competição de cultivares. **Ciência Rural**, v. 28, n.2, p. 225-228, 1998.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p. 176-177, 1962.

PERIPOLLI, M.; DEAK, E. A.; LOPES, G.; BURG, G. M.; STECCA, J. D. L. Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de soja submetidas a diferentes inoculações. In: 41^a Reunião Pesquisa de Soja Região Sul, **Anais Ata e Resumos**, Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2016.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental.** 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477p.

SANTOS, C. R. S. Stimulate na germinação de sementes, vigor de plântulas e no crescimento inicial de soja. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SANTOS, C.M.G.; VIEIRA, E.L. **Efeito de bioestimulante na germinação de grãos, vigor de plântulas e crescimento inicial do algodoeiro.** Magistra, v.17, p.124-130, 2005

SANTOS, J. O. **Manejo da soja com aplicação de biofertilizantes no sulco de semeadura.** Botucatu: Unesp. Botucatu, 2020. 64p.

SILVA, L. C.; DA SIVA, K. V.; MINGOTTE, F. L. C.; DE SOUZA, J. R. Qualidade fisiológica de sementes de milho e de soja em função do tratamento em pré-semeadura com enraizador bioativador. **Science and Technology Innovation in Agronomy**, v. 3, n. 1, p. 152-162, 2019.

VASCONCELOS, A. C. F. **Uso de bioestimulantes nas culturas de milho e soja.** Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

VIEIRA, E.L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max (L.) Merril*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) e o arroz (*Oriza sativa L.*).** Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2001.

VIEIRA, E.L; CASTRO, P.R.C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes.** Brasilia, v. 23, n. 2, p. 222-228. 2001.