

***RESULTADOS DE PESQUISA DA
EMBRAPA SOJA - 2000
MICROBIOLOGIA DE SOLOS***

Organização:

Clara Beatriz Hoffmann-Campo
Embrapa Soja
Odilon Ferreira Saraiva
Embrapa Soja



Comitê de Publicações

Presidente	JOSÉ RENATO BOUÇAS FARIAS
Secretária Executiva	CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO
Membros	ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO ANTÔNIO RICARDO PANIZZI CARLOS ALBERTO ARRABAL ARIAS FLÁVIO MOSCARDI JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO LÉO PIRES FERREIRA NORMAN NEUMAIER ODILON FERREIRA SARAIVA
Bibliotecário	ADEMIR BENEDITO ALVES DE LIMA
Coordenador de Editoração	ODILON FERREIRA SARAIVA

Diagramação

NEIDE MAKIKO FURUKAWA SCARPELIN

Tiragem

400 exemplares
Agosto/2001

Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2000: microbiologia de solos / Clara Beatriz Hoffmann Campo, Odilon Ferreira Saraiva (organizador). - Londrina: Embrapa Soja, 2001.
39p. -- (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.163)

1.Soja-Microbiologia do solo-Brasil. 2.Microbiologia do solo. I.Hoffmann Campo, Clara Beatriz. II.Saraiva, Odilon Ferreira. III.Título. IV.Série.

CDD 633.340981

APRESENTAÇÃO

Neste Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja são apresentados os principais trabalhos de pesquisa executados nesta Unidade, durante o ano de 2000. Têm por objetivo, informar aos pesquisadores, aos professores, aos técnicos ligados à extensão rural e à assistência técnica e aos demais interessados as mais recentes pesquisas em soja, girassol e trigo desenvolvidas pela Embrapa Soja. Num elenco de nove volumes, estão contidos trabalhos relativos aos projetos e aos subprojetos inseridos nos programas 01 (Recursos Naturais), 02 (Recursos Genéticos), 04 (Grãos), 12 (Automação), 13 (Desenvolvimento), 14 (Informação) e 18 (Comunicação e Negócios).

No presente volume são apresentados os principais resultados obtidos na área de Microbiologia de Solos.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

SUMÁRIO

ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA	7
1. Caracterização Genética, Fisiológica e Bioquímica de Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> para a Cultura da Soja de Solos da Região Sul e do Cerrado e com Maior Eficiência de Fixação do Nitrogênio e Capacidade Competitiva (04.0.94.322-02)	8
2. Experimentação em Rede Nacional para Recomendação de Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e Inoculantes (04.0.94.322-03)	13
3. Caracterização e Seleção de Genótipos de Soja para a Fixação Biológica do N ₂ e Obtenção de Genótipos mais Responsivos (04.0.94.322-04)	18
4. Interação entre Espécies Vegetais e Microrganismos do Solo em Sistemas de Rotação e Sucessão de Culturas em Semeadura Direta ou Preparo Convencional do Solo (04.0.94.322-05)	23
5. Efeito Ecológico e Mutagênico do Al e Mn sobre o <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> (04.1994.322-15)	28
6. Compatibilidade de Aplicação Conjunta nas Sementes, de Fungicidas, Micronutrientes e Inoculantes, sobre a Sobrevivência do <i>Bradyrhizobium</i> e a Eficiência de Fixação Biológica do Nitrogênio (04.0.94.322-18)	29

ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA

Nº do Projeto: 04.0.94.322

Líder: Mariangela Hungria

Nº de Subprojetos que compõem o projeto: 18

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Embrapa Arroz e Feijão, Embrapa Trigo, Embrapa Agropecuária Oeste, Embrapa Agrobiologia, FECOTRIGO, IPA (Pernambuco), Universidade Federal de Minas Gerais; **Apoio Técnico:** IAPAR, Universidade Federal de Uberlândia, Embrapa Recursos Genéticos; **Apoio Financeiro:** CNPq, FINEP, MCT; **Outras participações:** Universidade Federal do Paraná, Depto. de Bioquímica e Depto. de Genética, Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Microbiologia e Depto. de Genética, ANPI, FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, RS), COAMO, COCAMAR

A soja é uma cultura que apresenta alta demanda de N que, no Brasil, está sendo satisfeita pelo processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), realizado por bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. Na ausência desse processo biológico seriam necessários, para atingir os níveis atuais de produtividade brasileira, cerca de 400 kg de N/ha como fertilizantes nitrogenados, representando um custo certamente proibitivo para os agricultores. Entretanto, o lançamento de cultivares mais produtivas e o estabelecimento de uma população de estirpes, no solo, que não são as mais eficientes de que se dispõe hoje, mas que foram introduzidas com as primeiras inoculações, tornam necessários o desenvolvimento de linhas de pesquisa visando à manutenção e, principalmente, à elevação dos níveis de N fornecidos à soja via FBN. Essa meta deve ser conseguida através de pesquisas básicas e aplicadas relacionadas tanto com o microssimbionte como com a planta hospedeira. Nesse contexto, este projeto inclui 18 subprojetos, que foram conduzidos, durante sete anos, por Centros da Embrapa, Instituições de Pesquisa e Universidades, conforme relação acima, com 13 objetivos principais: **Objetivo 1:** Selecionar estirpes de *B. japonicum/B. elkanii* com alta eficiência de FBN e capacidade competitiva, que sejam capazes de promover ganhos expressivos no rendimento de soja em solos contendo populações estabelecidas. **Objetivo 2:** Caracterizar as populações de *B. japonicum/B. elkanii* estabelecidas nos solos e outras estirpes promissoras, em relação a diversos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genéticos, procurando relacionar esses parâmetros com a capacidade competitiva e eficiência de FBN, a fim de facilitar programas de seleção de estirpes no futuro. **Objetivo 3:** Obter mutantes de estirpes de *B. japonicum/B. elkanii* mais eficientes e competitivas, que venham a contribuir com incrementos

no rendimento da soja e no teor de N dos grãos. **Objetivo 4:** Testar as estirpes e combinações de estirpes que sejam mais eficientes na FBN e mais competitivas, em diferentes locais e condições de produção de soja no país, para a sua utilização em inoculantes comerciais. **Objetivo 5:** Avaliar genótipos de soja quanto à eficiência de FBN e quanto à restrição da nodulação pelas estirpes de *B. japonicum*/*B. elkanii* dominantes nos solos brasileiros. Nos genótipos que restringem a nodulação, verificar as taxas de fixação com estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas e de alta eficiência de FBN. **Objetivo 6:** Avaliar genótipos de soja para a nodulação com estirpes de crescimento rápido (*Sinorhizobium fredii*). **Objetivo 7:** A partir de um genótipo de soja eficiente para a FBN, obter mutantes tolerantes que fixem N_2 mesmo na presença de teores elevados de nitrato no solo. **Objetivo 8:** Determinar o balanço de N em sistemas de rotação de culturas envolvendo a soja, milho e adubos verdes, típicos da Região Sul e dos Cerrados, sob os sistemas de semeadura direta ou sob preparo convencional do solo, visando maximizar a contribuição da FBN e estabelecer critérios para a adubação nitrogenada. **Objetivo 9:** Avaliar a influência das populações de actinomicetos na simbiose soja-*Bradyrhizobium*, visando a maximização do potencial de FBN, particularmente pela alteração na competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium*, permitindo um aumento na produtividade da cultura. **Objetivo 10:** Obter informações que permitam e justifiquem produzir inoculantes mistos, contendo bactérias, fungos micorrízicos e sinais moleculares, visando incrementar a produtividade em sistemas de rotação e sucessão de culturas. **Objetivo 11:** Demonstrar, através de análises econômicas, os benefícios da inoculação das melhores estirpes com os principais genótipos de soja, dentro do manejo agrícola recomendado em cada região. **Objetivo 12:** Validar, a nível de campos experimentais de cooperativas e de propriedades rurais, as novas tecnologias geradas. **Objetivo 13:** Difundir as novas tecnologias e recomendações técnicas para a assistência técnica e produtores rurais.

1. Caracterização Genética, Fisiológica e Bioquímica de Estirpes de *Bradyrhizobium* para a Cultura da Soja de Solos da Região Sul e do Cerrado e com Maior Eficiência de Fixação do Nitrogênio e Capacidade Competitiva (04.0.94.322-02)

Mariangela Hungria¹, Lu Shi Chen²,
Lígia Maria O. Chueire¹ e Rubens J. Campo¹

1.1. Caracterização de isolados de *Bradyrhizobium* obtidos a partir de nódulos de soja coletados nos dois principais estados produtores do Paraguai

A cultura da soja foi introduzida no Paraguai na década de 20 e o cultivo comercial tem sido praticado desde a década de 70. O Paraguai não tem programa de seleção de estirpes nem de controle de qualidade de inoculantes, mas verifica-se nodulação na maioria das áreas produtoras, embora a inoculação só

¹ Embrapa Soja

² Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina

seja praticada em 15 a 20% das áreas sob cultivo. Pouco se conhece sobre a biodiversidade de rizóbio na América do Sul e nenhum estudo havia sido conduzido no Paraguai. Com o objetivo de conhecer a diversidade de rizóbio capaz de nodular a soja nesse País vizinho ao Brasil, 78 isolados foram obtidos a partir de nódulos coletados, a campo, em 16 localidades, nos dois principais estados produtores de soja, Itapúa (locais: Bella Vista, Capitán Meza, Capitán Miranda, Edelira, Encarnación, General Delgado, Obligado, Pirapó e San Pedro del Paraná) e Alto Paraná (locais: Domingo M. Irala, Hernandarias, Juan L. Mayorquín, Mbaracayú, Santa Rita, Santa Rosa e Tavapy). Os isolados de rizóbio foram caracterizados em relação a diversos parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos: morfologia de colônia, tolerância a estresses ambientais, resistência intrínseca a antibióticos, síntese de ácido indol acético *in vitro*, perfil de proteínas, de lipopolissacarídeos e de ERIC-REP-PCR e seqüência da região gênica do DNA que codifica o gene 16S rRNA, bem como quanto à eficiência da simbiose.

Cinquenta e oito isolados apresentaram taxas de crescimento lento e reação alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, enquanto 20 outros apresentaram taxas de crescimento rápido e reação ácida. A maioria dos isolados não tolerou acidez (pH 4.5) ou temperatura elevada (40°C) *in vitro*. Apenas dois dos 78 isolados apresentaram perfis de proteínas, de lipopolissacarídeos e de ERIC-REP-PCR semelhan-

tes e, portanto, a maioria dos isolados representou estirpes únicas. Dois grupos principais foram formados com as bactérias de crescimento lento, um com bactérias com propriedades fisiológicas semelhantes a *Bradyrhizobium japonicum*, como baixa síntese de ácido indol acético e baixa tolerância a antibióticos, e outro com características de *B. elkanii*. Entretanto, os isolados de crescimento lento apresentaram um grau elevado de polimorfismo em relação às estirpes de referência, com alto grau de diversidade.

A análise genética pela amplificação do DNA pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia de polimerase), com os oligonucleotídeos específicos ERIC e REP confirmou que a maioria dos isolados representava estirpes únicas. Dez isolados representativos dos grupos de ERIC-REP-PCR foram submetidos ao seqüenciamento da região do DNA que codifica o 16S rRNA. Quatro isolados de crescimento lento (PRY 1, 2, 40 e 42) que apresentaram propriedades de *B. japonicum* confirmaram a relação genética com essa espécie, enquanto dois outros (PRY 49 e 52) confirmaram semelhança genética com *B. elkanii* (Fig. 12.1). Quanto aos isolados de crescimento lento, dois deles, PRY 71 e 73 apresentaram semelhança genética com *Rhizobium* espécie genômica Q estirpe BDV 502, isolada de um arbusto nativo da Austrália e que, por sua vez é relacionada com *R. tropici*, uma espécie nativa do Brasil e que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). O seqüenciamento parcial da região 16S rRNA de dois isolados de crescimento rápido (PRY 62 e 65)

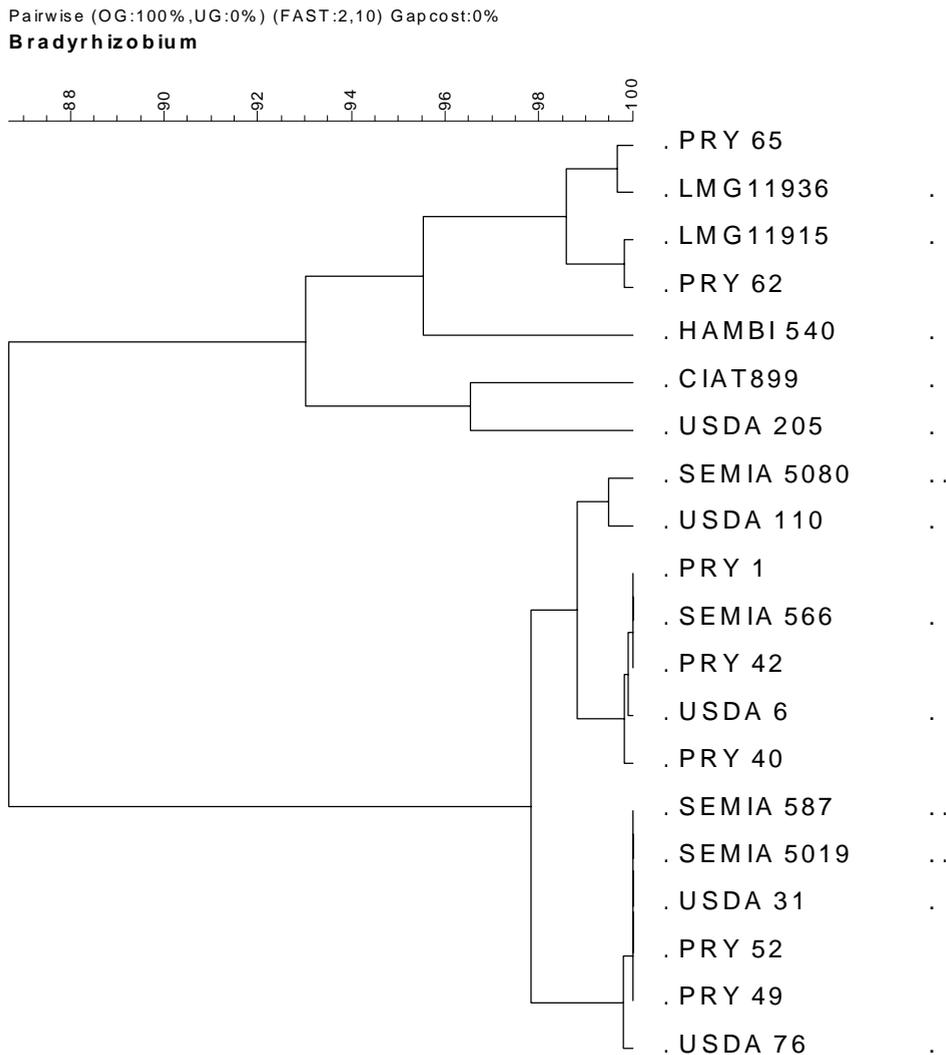


FIG. 1. Dendrograma construído usando o algoritmo UPGMA com as sequências alinhadas da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, de dez isolados (PRY) obtidos de nódulos de soja a campo no Paraguai e de 14 estirpes de referência pertencentes a três gêneros de rizóbio que nodulam a soja

pertencentes ao mesmo grupo de perfil de ERIC-REP-PCR indicou semelhança com *Agrobacterium* spp. (Fig. 1); ambos isolados estabeleceram simbioses eficientes com a cultivar BR-16 de soja.

Dentro da diversidade observada, al-

guns isolados com desempenho simbiótico superior foram identificados (Tabela 1) e serão testados, a campo, em uma busca por estirpes mais eficientes ou competitivas para o uso em inoculantes comerciais no Paraguai.

TABELA 1. Número de nódulos [$\ln(n^\circ \text{ nódulos} + 1)/\text{vaso}$], massa de nódulos secos (g/vaso) e massa (g/vaso) e N total acumulado na parte aérea (mg N/vaso) de soja^a, cultivar BR 16 inoculada com 78 estirpes obtidas a partir de nódulos coletados a campo no Paraguai e com as estirpes de referência *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, *B. japonicum* SEMIA 5080 e *Sinorhizobium fredii* USDA 205.

Isolado/Estirpe	Número nódulos	Massa de nódulos	Massa parte aérea	N total da parte aérea
..... Crescimento lento				
1	4,94 ^d _b	0,229 ^b	3,75 ^c	90,65 ^c
2	4,91 ^d	0,204 ^b	3,45 ^c	93,34 ^c
3	4,82 ^c	0,210 ^b	3,27 ^c	88,30 ^c
4	4,72 ^c	0,219 ^b	3,45 ^c	91,69 ^c
5	4,99 ^d	0,397 ^d	3,79 ^c	111,47 ^c
6	4,80 ^c	0,330 ^c	2,90 ^b	81,60 ^b
7	5,11 ^d	0,606 ^e	4,24 ^d	95,74 ^c
8	4,84 ^c	0,375 ^c	3,11 ^b	67,25 ^b
9	4,96 ^d	0,579 ^e	4,17 ^d	102,89 ^c
10	4,98 ^d	0,403 ^d	3,68 ^c	101,38 ^c
11	4,79 ^c	0,335 ^c	3,39 ^c	68,66 ^b
12	5,10 ^d	0,440 ^d	4,01 ^d	96,58 ^c
13	5,15 ^d	0,525 ^e	3,98 ^d	112,21 ^c
14	4,66 ^c	0,388 ^d	3,67 ^c	104,58 ^c
15	5,01 ^d	0,528 ^e	4,49 ^d	114,17 ^c
16	4,88 ^c	0,339 ^c	4,19 ^d	110,61 ^c
17	4,97 ^d	0,274 ^b	2,66 ^b	70,77 ^b
18	4,82 ^c	0,355 ^c	3,25 ^c	87,30 ^c
19	4,68 ^c	0,247 ^b	2,88 ^b	65,72 ^b
20	4,79 ^c	0,278 ^b	2,74 ^b	69,66 ^b
21	4,49 ^b	0,233 ^b	2,44 ^b	61,59 ^b
22	4,99 ^d	0,380 ^c	3,56 ^c	84,60 ^b
23	4,59 ^b	0,294 ^b	2,63 ^b	59,71 ^b
24	4,74 ^c	0,251 ^b	2,28 ^b	68,08 ^b
25	5,04 ^d	0,541 ^e	3,67 ^c	103,63 ^c
26	5,11 ^d	0,466 ^d	3,75 ^c	82,47 ^b
27	5,03 ^d	0,642 ^e	4,44 ^d	125,75 ^d
28	4,88 ^c	0,303 ^c	2,75 ^b	73,72 ^b
29	4,76 ^c	0,346 ^c	3,30 ^c	76,77 ^b
30	4,84 ^c	0,392 ^d	3,97 ^d	90,80 ^c
31	4,90 ^c	0,393 ^d	3,66 ^c	96,07 ^c
32	4,86 ^c	0,393 ^d	3,79 ^c	95,45 ^c
33	4,73 ^c	0,346 ^c	3,88 ^c	107,00 ^c
34	4,90 ^c	0,424 ^d	3,38 ^c	85,58 ^b
35	4,72 ^c	0,436 ^d	4,10 ^d	94,07 ^c

Continua...

...Continuação Tabela 1

Isolado/Estirpe	Número nódulos	Massa de nódulos	Massa parte aérea	N total da parte aérea
36	4,68c	0,266b	2,83b	66,32b
37	4,68c	0,255b	2,61b	61,86b
38	4,73c	0,292b	3,42c	104,08c
39	4,71c	0,346c	3,17b	99,22c
40	4,99d	0,546e	4,31d	147,33d
41	4,89c	0,518e	4,11d	130,51d
42	4,97d	0,567e	4,54d	154,41d
43	4,84c	0,405d	3,35c	89,14c
44	5,10d	0,407d	4,34d	110,26c
45	4,90c	0,665e	4,75d	146,02d
46	4,89c	0,373c	3,43c	86,58c
47	4,91c	0,506e	4,67d	158,16d
48	4,73c	0,348c	3,59c	100,41c
49	4,82c	0,400d	3,89c	109,04c
50	5,03d	0,627e	4,47d	125,46d
51	4,82c	0,149a	1,67a	39,77a
52	5,10d	0,549e	3,94c	122,87d
53	4,75c	0,318c	3,09b	83,49b
54	5,14d	0,515e	3,98d	95,07c
55	5,01d	0,450d	3,92c	109,02c
56	4,88c	0,372c	3,54c	89,74c
57	5,03d	0,583e	4,49d	104,68c
58	5,05d	0,269b	2,63b	52,25b
Média	4,88	0,39	3,58	95,10
..... Crescimento rápido				
59	4,23a	0,046a	1,27a	26,39a
60	5,26d	0,595e	4,18d	124,16d
61	4,82c	0,255b	2,76b	78,90b
62	5,08d	0,474d	3,78c	115,24c
63	4,85c	0,515e	3,97d	81,75b
64	4,94d	0,593e	4,15d	92,08c
65	5,08d	0,559e	4,41d	115,54c
66	4,97d	0,589e	4,14d	101,24c
67	4,94d	0,269b	2,48b	57,65b
68	4,44b	0,222b	2,08a	67,09b
69	4,41b	0,067a	1,25a	20,38a
70	4,71c	0,329c	3,10b	73,81b
71	4,89c	0,522e	4,34d	135,70d
72	5,06d	0,512e	4,35d	119,95d
73	4,59b	0,436d	4,48d	122,25d
74	4,35b	0,071a	1,33a	18,08a
75	4,04a	0,035a	1,25a	11,54a

Continua...

...Continuação Tabela 1

Isolado/Estirpe	Número nódulos	Massa de nódulos	Massa parte aérea	N total da parte aérea
76	4,95 d	0,415 d	3,45 c	101,57 c
77	5,01 d	0,476 d	4,53 d	123,22 d
78	4,94 d	0,304 c	2,95 b	79,30 b
Média	4,78	0,36	3,21	83,29
..... Estirpes de referência				
SEMIA 587	4,93 d	0,612 e	4,79 d	143,60 d
SEMIA 5080	4,97 d	0,454 d	4,54 d	138,42 d
USDA 205	4,95 d	0,269 b	1,86 a	37,50 a

^a Plantas crescidas em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard, com duas plantas por vaso, recebendo solução nutritiva isenta de N e coletadas aos 45 dias após a emergência.

^b Médias de três repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott & Knott ($p \leq 0,05$).

2. Experimentação em Rede Nacional para Recomendação de Estirpes de *Bradyrhizobium* e Inoculantes (04.0.94.322-03)

Rubens José Campo¹ e Mariangela Hungria¹

Avanços técnicos do cultivo da soja como o uso de cultivares mais produtivas e resistentes, maior controle da erosão pelo uso do sistema de semeadura direta, práticas culturais mais adequadas como rotação de cultura e melhor densidade de semeadura, melhor controle de plantas daninhas, melhor controle de pragas e doenças e o uso de adubações corretivas e de manutenção mais eficazes resultam em aumentos sucessivos da produtividade da soja. Por consequência, aumenta a demanda de N e, como a principal fonte de N para a cultura é através do processo de fixação biológica do N₂ (FBN), necessita-se aumentar a eficiên-

cia da FBN. Resultados anteriores desse subprojeto permitiram otimizar a tecnologia de uso de inoculantes turfosos, com água açucarada a 10%, melhorando a aderência do inoculante às sementes. Essa nova recomendação de inoculação aumentou a eficiência de FBN e a produtividade da soja foi aumentada em 4,5% (2,25 sacos/ha). Outra técnica para aumentar a eficiência de FBN que vem sendo estudada nesse subprojeto é a que objetiva identificar, avaliar e selecionar estirpes ou combinações de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* que permitam maior eficiência da FBN nos processos de reinoculação da soja. Quatro estirpes de *Bradyrhizobium*, atualmente recomendadas para os inoculantes comerciais, e quatro isolados da região de solos do cerrado estão sendo avaliados e comparados com dois tratamentos testemunha, sem inoculação e com aplicação de 200kg de N mineral por hectare, em experimentos de campo, delinea-

¹ Embrapa Soja

dos em blocos ao acaso com seis repetições. Nesta safra, outros dois tratamentos, aplicação de 20kg de N na semeadura e 45kg de N em cobertura, semeados nos sistemas direto e convencional, foram incluídos no experimento instalado em Londrina, PR. Os experimentos são conduzidos em rede nacional, inicialmente em oito locais, e tiveram uma análise global dos resultados em 1996, mostrando que a reinoculação da soja com as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5080 incrementou a produtividade da soja em 7,8% e 3,8%, para as Regiões Sul e Central, respectivamente. Esses estudos se en-

cerram nesta safra, 1999/00, e uma análise completa dos resultados, para anos e locais, será efetuada para atender o objetivo proposto, embora, neste momento, somente os resultados da safra 1999/00 serão apresentados.

Conforme tem sido constatado nos anos anteriores, a reinoculação da soja aumenta a eficiência de FBN para algumas combinações de estirpes em alguns dos parâmetros avaliados. Na safra 1999/00 os resultados não diferiram, substancialmente, dos anos anteriores. Nas Tabelas 2, 3, e 4 são apresentados os resultados de número de nódulos,

TABELA 2. Efeito da reinoculação da soja, cv. BR 37 semeada por método convencional, com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N na massa seca da parte aérea da planta, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Londrina, PR, safra 99/00, em solo LRd com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($2,4 \times 10^5$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2000

Tratamento	Nodulação		N Total (mg/pl.)	N grãos (kg N/ha)	Rend. ¹¹ (kg/ha)
	nº/pl.	mg/pl.			
Test. Sem Inoculação	13	17	57	145	2679
N - 200 kg/ha (50% + 50%) ¹	4	5	49	136	2463
N - 20 kg/ha PLANTIO	9	10	55	147	2759
N - 45 kg/ha FLORAÇÃO	10	12	55	158	2960
SEMIA 587 + SEMIA 5019 ²	9	10	46	129	2450
SEMIA 587 + SEMIA 5079 ³	11	13	46	134	2466
SEMIA 587 + SEMIA 5080 ⁴	10	23	45	146	2710
SEMIA 5019 + SEMIA 5079 ⁵	11	16	57	150	2801
SEMIA 5019 + SEMIA 5080 ⁶	10	12	55	149	2769
SEMIA 5079 + SEMIA 5080 ⁷	11	14	58	160	2988
CPAC 40 + CPAC 44 ⁸	12	13	55	164	3031
CPAC 42 + CPAC 45 ⁹	11	11	38	160	2988
CV (%)	13,2	66,3	28,0	15,4	14,6
DMS (5%) ¹⁰	2,5	7,5	13,9	18,6	328

¹N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia; ²população de células/g inoculante, $1,5 \times 10^{10}$; ³população, $1,5 \times 10^{10}$; ⁴população, $2,5 \times 10^{10}$; ⁵população, $1,8 \times 10^{10}$; ⁶população, $3,4 \times 10^{10}$; ⁷população, $1,7 \times 10^{10}$; ⁸população, $2,5 \times 10^{10}$; ⁹população, $1,8 \times 10^{10}$; ¹⁰diferença entre médias de dois tratamentos, cujo valor é superior a esses valores, para cada coluna, indica que os dois tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t"; ¹¹rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 3. Efeito da reinoculação da soja, cv. BR 37 semeada por método direto, com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação (por planta), N na massa seca da parte aérea da planta, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Londrina, PR, safra 99/00, em solo LRd com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($2,4 \times 10^5$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2000

Tratamento	Nodulação		N Total (mg)	N (kg N/ha)	Rend. ⁹ (kg/ha)
	nº/pl.	mg/pl.			
Test. Sem Inoculação	16	32	45	150	2810
N - 200 kg/ha (50% + 50%) ¹	3	3	63	163	3014
N - 20 kg/ha PLANTIO	12	29	47	160	2961
N - 45 kg/ha FLORAÇÃO	17	29	40	164	3064
SEMIA 587 + SEMIA 5019 ²	18	20	51	161	2924
SEMIA 587 + SEMIA 5079 ³	15	27	41	156	2858
SEMIA 587 + SEMIA 5080 ⁴	13	23	41	169	3051
SEMIA 5019 + SEMIA 5079 ⁵	15	24	50	172	2991
SEMIA 5019 + SEMIA 5080 ⁶	14	28	49	161	2703
SEMIA 5079 + SEMIA 5080 ⁷	15	28	48	190	3089
CV(%)	6,7	20,1	24,7	11,4	11,4
DMS (5%) ⁸	2,6	8,8	9,7	21,4	382

¹N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia; ²população de células/g inoculante, $1,5 \times 10^{10}$; ³população, $1,5 \times 10^{10}$; ⁴população, $2,5 \times 10^{10}$; ⁵população, $1,8 \times 10^{10}$; ⁶população, $3,4 \times 10^{10}$; ⁷população, $1,7 \times 10^{10}$; ⁸diferença entre médias de dois tratamentos, cujo valor é superior a esses valores, para cada coluna, indica que os dois tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t"; ⁹rendimento corrigido para 13% de umidade.

massa de nódulos secos, N total na parte aérea e nos grãos e rendimento de grãos. As comparações entre os tratamentos foi feita entre as médias, duas a duas, sempre comparadas com o tratamento sem inoculação. Visando diferenciar a eficiência de fixação simbiótica de N nos sistemas de cultivo de soja, o experimento de Londrina foi instalado no mesmo solo, com população estabelecida de *Bradyrhizobium* de $2,4 \times 10^5$, células/g solo nos sistemas de semeadura direta e convencional. No sistema de semeadura convencional (Tabela 2), verificou-se que a adição de N mineral na semeadura re-

duziu o número e a massa de nódulos. Em relação à massa de nódulos, nenhum tratamento diferiu, estatisticamente, do tratamento sem reinoculação, exceto quando foram adicionados 200kg N/ha, inibindo a formação de nódulos. Para o parâmetro N total na massa seca da parte aérea, a combinação de estirpes CPAC 42 + CPAC 45 apresentou N total inferior à testemunha sem reinoculação; os demais tratamentos não diferiram da testemunha sem reinoculação. Contudo, é importante salientar que o tratamento com 200kg N/ha resultou em menor acúmulo de N na parte aérea do que o tratamento

TABELA 4. Efeito da reinoculação da soja, cv. BR 37 semeada por método convencional, com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação (por planta), N total na massa seca da parte aérea, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Ponta Grossa, PR, safra 99/00, em solo LVa, com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($1,1 \times 10^6$ células/g de solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2000

Tratamento	Nodulação		N Total (mg/pl.)	N grãos (kg N/ha)	Rend. ¹¹ (kg/ha)
	nº/pl.	mg/pl.			
Test. Sem Inoculação	19	23	210	147	2383
N - 200 kg/ha (50% + 50%) ¹	9	7	271	127	2259
N - 20 kg/ha PLANTIO	16	20	181	130	2447
N - 45 kg/ha FLORAÇÃO	19	23	205	131	2398
SEMIA 587 + SEMIA 5019 ²	18	22	202	138	2484
SEMIA 587 + SEMIA 5079 ³	17	22	178	139	2437
SEMIA 587 + SEMIA 5080 ⁴	20	23	150	124	2174
SEMIA 5019 + SEMIA 5079 ⁵	18	22	173	132	2319
SEMIA 5019 + SEMIA 5080 ⁶	18	19	201	117	2086
SEMIA 5079 + SEMIA 5080 ⁷	17	22	187	120	2086
CPAC 40 + CPAC 44 ⁸	19	24	174	132	2263
CPAC 42 + CPAC 45 ⁹	20	26	182	131	2295
CV (%)	5,7	19,5	20,2	13,8	12,6
DMS (5%) ¹⁰	2,3	3,7	32,0	16,8	279

¹N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia; ²população de células/g inoculante, $1,5 \times 10^{10}$; ³população, $1,5 \times 10^{10}$; ⁴população, $2,5 \times 10^{10}$; ⁵população, $1,8 \times 10^{10}$; ⁶população, $3,4 \times 10^{10}$; ⁷população, $1,7 \times 10^{10}$; ⁸população, $2,5 \times 10^{10}$; ⁹população, $1,8 \times 10^{10}$; ¹⁰diferença entre médias de dois tratamentos, cujo valor é superior a esses valores, para cada coluna, indica que os dois tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t"; ¹¹rendimento corrigido para 13% de umidade.

testemunha, embora não diferindo estatisticamente, indicando não haver necessidade de aplicação de fertilizante nitrogenado. Para os parâmetros N total nos grãos e rendimento de grãos, a combinação de estirpes CPAC 40 + CPAC 44 apresentou valores superiores à testemunha sem reinoculação, os demais pares não diferiram da testemunha, embora bons desempenhos também tenham sido constatados pela reinoculação com as combinações de estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080 e CPAC42 + CPAC45.

A média de rendimento das 8 combinações de estirpes foi de 2775kg/ha, 3,6% superior à testemunha sem reinoculação, o que confirma a importância econômica da reinocular e reforça a recomendação atual da pesquisa, que é a de se efetuar a reinoculação da soja anualmente. Pelos resultados mostrados na Tabela 2 verifica-se, ainda, que a aplicação de N mineral, na dose 100 kg/ha, 50% na semeadura, mais 50% 35 dias após emergência, ou a dose de arranque, de 20kg de N na semeadura, ou a aplicação do N

na floração (45kg de N/ha) não apresentaram resultados que justifiquem o uso desse nutriente em detrimento da reinoculação.

No sistema de semeadura direta em solo com população de *Bradyrhizobium* elevada, (Tabela 3) também verificou-se pouco efeito da aplicação das combinações de estirpes no número e massa de nódulos secos, mas um forte efeito negativo da aplicação do N mineral sobre estes parâmetros. Verifica-se, ainda, que a aplicação de 200kg de N mineral aumentou o N total da massa seca, diferenciando-o dos demais tratamentos, sem no entanto redundar em aumentos significativos do rendimento de grãos. Os outros tratamentos com aplicação de N e as combinações de estirpes não diferiram da testemunha sem reinoculação. Para o parâmetro N total nos grãos, somente as combinações de estirpes SEMIA 5019 + SEMIA 5079 e SEMIA 5079 + 5080 apresentaram valores de N total nos grãos superiores à testemunha sem inoculação; os demais tratamentos não diferiram da testemunha sem reinoculação. Para a produtividade de grãos, verifica-se que todos os tratamentos não diferiram da testemunha sem reinoculação, embora, por exemplo, a combinação de estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080 apresentou rendimentos superiores ao tratamento sem reinoculação de 9,9%. Similarmente ao experimento com semeadura convencional, a média de todas as combinações de estirpes apresentou aumento de rendimentos de 4,5%, em relação ao tratamento sem inoculação e,

novamente, a aplicação de N mineral foi ineficaz.

Em Ponta Grossa, (Tabela 4), o experimento foi instalado em solo populada com estabelecida de *Bradyrhizobium* de $1,1 \times 10^6$ células/g de solo. Similarmente aos experimentos anteriores, a maior influência sobre a nodulação dos tratamentos, em relação ao tratamento sem reinoculação, foi para os tratamentos que receberam N na semeadura, exceção para a combinação de estirpes SEMIA 5019 + SEMIA 5080, que apresentou menor massa de nódulos secos do que a testemunha. Novamente, nesse experimento, a aplicação de 200kg de N mineral aumentou o N na massa seca da planta em relação à testemunha. Por outro lado, as combinações de estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5080, SEMIA 5019 + SEMIA 5079 e os isolados CPAC 40 + CAPAC 44 apresentaram N total na massa seca da parte aérea inferior ao tratamento testemunha. Por problemas de deficiência hídrica, ocorridos no enchimento de grãos, os resultados de N total nos grãos e rendimento de grãos foram bastante prejudicados. As combinações de estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5080, SEMIA 5019 + SEMIA 5080 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080 apresentaram N total nos grãos inferior à testemunha, sendo que essas duas últimas combinações apresentaram, ainda, menores rendimentos de grãos. Mesmo nessas condições de deficiência hídrica, a aplicação de fertilizante nitrogenado não resulta em incremento no rendimento de grãos.

◆◆◆◆

3. Caracterização e Seleção de Genótipos de Soja para a Fixação Biológica do N₂ e Obtenção de Genótipos mais Responsivos (04.0.94.322-04)

Marisa F. Nicolás², Mariangela Hungria¹,
Carlos A. Arrabal Arias¹ e Rubens J. Campo¹

3.1. Variabilidade entre genótipos de soja quanto à capacidade de fixação

Neste ano, foram completadas as análises de experimentos que tinham por objetivo o estudo das características genéticas de nodulação e fixação de nitrogênio de cultivares brasileiras de soja. Foram identificadas quatro cultivares com diferentes capacidade de FBN: J-200 e Bossier (alta), Embrapa 20 (média) e Embrapa 133 (baixa) e todos os cruzamentos possíveis, incluindo recíprocos, foram realizados para obter as gerações F1 e F2 e as famílias F3 foram obtidas pelo método SSD (single seed descent). Três experimentos foram conduzidos simultaneamente, sob condições de casa de vegetação, com o conjunto restrito de gerações P1, P2, F2 e F3 e as plantas foram avaliadas quanto à nodulação (número de nódulos, NN e massa de nódulos secos, MNS) e crescimento das plantas (massa da parte aérea seca, MPAS). Os dados obtidos estão apresentados nas Tabelas 5 a 7. Não foram observados efeitos recíprocos, conseqüentemente, os dados das plantas recíprocas F2 e F3 fo-

ram agrupados. A freqüência de distribuição das variáveis testadas nas famílias F3 mostrou segregação transgressiva e distribuição contínua, típicas de herança poligênica. Nos cruzamentos J-200 X Embrapa 133 e Bossier X Embrapa 133, a significância dos efeitos genéticos de médias e variâncias foi menos freqüente, mas eventualmente observada para NN e MNS. Nos dois outros experimentos, houve predominância dos efeitos genéticos aditivos [d] e/ou D para a maioria das variáveis testadas, exceto para MNS no cruzamento J-200 X Bossier. Os efeitos de dominância genética [h] e/ou H foram detectados para todas as variáveis no cruzamento Embrapa 20 X Embrapa 133 e para a razão MNS/NN para Bossier X Embrapa 20. Efeitos epistáticos aditivo x aditivo [i] e interação genótipo x microambiente foram menos freqüentes em todos os experimentos. As estimativas de herdabilidade no senso restrito (h^2) variaram de 39% a 77%, com valores maiores para MPAS, NN e MNS no cruzamento Bossier X Embrapa 20 e MPAS no cruzamento Embrapa 20 X Embrapa 133. A predição do potencial genético para gerar linhagens superiores em relação à FBN indicou que a seleção pode ser mais efetiva nos cruzamentos Bossier X Embrapa 20 e Embrapa 20 X Embrapa 133. Esses dois cruzamentos também podem ser usados para a busca de QTLs (quantitative trait loci), auxiliando a acelerar os programas de melhoramento que visam incrementar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da soja.

¹ Embrapa Soja

² Doutorado em Genética na Univerisade Federal do Paraná

TABELA 5. Graus de liberdade (g.l.), médias e variâncias (var.) das parentais e gerações F2 e F3 para os parâmetros de massa da parte aérea seca (MPAS, g/pl), número de nódulos (NN, n°/pl) e massa de nódulos secos (MNS, mg/pl) e para a relação MNS/NN obtidas para plantas de soja inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 566

Gerações	MPAS		NN		MNS		MNS/NN	
	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.
Experimento 1								
J-200	17	1,28a 0,14	17	66,72b 740,33	17	85,26b 1513,85	17	1,31a 0,27
Bossier	19	1,53a 0,23	19	101,40a 1841,94	19	125,59a 3779,40	19	1,34a 0,52
Embrapa 20	19	1,52a 0,06	19	64,60b 572,99	19	89,57b 2368,76	19	1,32a 0,24
Embrapa 133	19	1,46a 0,18	19	63,50b 1025,21	19	103,86ab 3089,04	19	1,67a 0,36
J-200 X Embrapa 133								
F2	58	1,51 0,18	58	76,27 839,37	58	117,37 1924,68	58	1,63 0,31
F3 total	238	1,45 0,15	238	66,19 910,91	238	100,63 2742,68	238	1,60 0,54
Entre (famílias)	59	0,14 0,14	59	1149,95 1149,95	59	2411,85 2411,85	59	0,56 0,56
Dentro (famílias)	179	0,16 0,16	179	830,69 830,69	179	2853,70 2853,70	179	0,53 0,53
Bossier X Embrapa 133								
F2	59	1,59 0,21	59	81,30 1087,91	59	120,57 2131,05	59	1,66 0,71
F3 total	237	1,49 0,15	237	69,32 1036,57	237	104,07 2453,53	237	1,65 0,87
Entre (famílias)	59	0,18 0,18	59	1365,72 1365,72	59	3015,82 3015,82	59	0,87 0,87
Dentro (famílias)	178	0,14 0,14	178	925,17 925,17	178	2263,21 2263,21	178	0,87 0,87
Experimento 2								
J-200	19	2,13b 0,26	19	83,70b 1397,48	19	241,93b 4645,13	19	3,21a 1,22
Bossier	19	2,74a 0,57	19	98,40ab 727,73	19	286,61a 3586,71	19	3,11a 1,07
Embrapa 20	19	2,55a 0,29	19	115,10a 689,15	19	244,11b 3027,72	19	2,17b 0,24
Embrapa 133	19	2,35ab 0,46	19	90,45b 1221,00	19	232,70b 5148,40	19	2,90a 1,93
J-200 X Embrapa 20								
F2	59	2,49 0,44	59	96,68 793,94	59	257,79 3116,36	59	2,80 0,54
F3 Total	239	2,60 0,46	239	96,77 734,83	239	264,31 3719,12	239	2,88 0,67
Entre (famílias)	59	0,76 0,76	59	945,68 945,68	59	6248,16 6248,16	59	1,02 1,02

Continua...

...Continuação Tabela 5

Gerações	MPAS		NN		MNS		MNS/NN	
	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.	g.l.	média ¹ var.
Dentro (famílias)	180	0,36	180	664,55	180	2876,11	180	0,55
Bossier X Embrapa 20								
F2	59	2,33	59	1074,82	59	5634,23	59	3,07
F3 Total	238	2,39	238	1333,87	238	5090,82	238	2,72
Entre (famílias)	59	1,25	59	2373,18	59	10655,30	59	1,02
Dentro (famílias)	179	0,40	179	985,10	179	3223,48	179	0,74
Experimento 3								
J-200	18	1,93b	18	67,16c	18	243,39ab	18	3,74a
Bossier	19	1,89b	19	91,30b	19	266,03a	19	2,99b
Embrapa 20	19	3,00a	19	114,45a	19	262,33a	19	2,39c
Embrapa 133	19	2,15b	19	95,10b	19	205,97b	19	2,19c
J-200 X Bossier								
F2	58	2,07	58	78,83	58	254,30	58	3,52
F3 Total	235	2,31	235	87,28	235	262,50	235	3,32
Entre (famílias)	59	1,43	59	2179,00	59	10571,84	59	1,64
Dentro (famílias)	176	0,47	176	1266,92	176	6097,17	176	1,25
Embrapa 20 X E. 133								
F2	59	2,84	59	104,60	59	269,76	59	2,67
F3 Total	239	2,84	239	1313,80	239	262,71	239	2,71
Entre (famílias)	59	1,32	59	1451,62	59	6391,24	59	0,76
Dentro (famílias)	180	0,51	180	1267,87	180	4734,11	180	0,65

¹ Médias de parentais seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (P<0.05) pelo teste de Duncan.

TABELA 6. Parâmetros genéticos ajustados para as médias e variâncias dos parâmetros de massa da parte aérea e nodulação

	J-200 x	Bossier x	J-200 x	Bossier x	J-200 x	Bossier x	J-200 x	Bossier x	J-200 x	Bossier x	J-200 x	Bossier x
	Embrapa 133	Embrapa 133	Embrapa 20	Embrapa 20	Embrapa 20	Embrapa 20	Embrapa 20	Embrapa 20	Bossier	Bossier	Embrapa 20	Embrapa 133
m	1,45 +/- 0,02	1,50 +/- 0,22	2,44 +/- 0,03	0,21 +/- 0,08	2,42 +/- 0,04	2,17 +/- 0,42	2,63 +/- 0,07	0,43 +/- 0,08				
[d]	-	-	-	-	-	-	0,64 +/- 0,26	2,38 ^{ns} / 1				
[h]	-	-	-	-	-	-	0,56 +/- 0,13					
χ^2 /g.l	4,91 ^{ns} / 3	2,70 ^{ns} / 3	1,99 ^{ns} / 2	0,22 +/- 0,07	5,87 ^{ns} / 3	15,96 ^s / 3 ²						
D	-	-	0,30 +/- 0,04	0,51 ^{ns} / 3	0,34 +/- 0,05	0,47 +/- 0,11	0,34 +/- 0,05	0,34 +/- 0,05				
H	-	-	0,17 +/- 0,01	5,89 ^{ns} / 4	5,14 ^{ns} / 3	1,18 ^{ns} / 3	4,20 ^{ns} / 3					
E	0,16 +/- 0,01	0,17 +/- 0,01	0,30 +/- 0,04	0,51 ^{ns} / 3	0,34 +/- 0,05	0,33 +/- 0,05	0,34 +/- 0,05					
χ^2 /g.l	1,19 ^{ns} / 4	5,89 ^{ns} / 4	0,51 ^{ns} / 3	0,51 ^{ns} / 3	5,14 ^{ns} / 3	1,18 ^{ns} / 3	4,20 ^{ns} / 3					
Número de nódulos (nº/pl)												
m	61,25 +/- 3,57	57,34 +/- 5,92	96,98 +/- 1,50	100,42 +/- 1,85	83,96 +/- 1,95	103,72 +/- 1,81						
[d]	-	18,95 +/- 5,99	16,52 +/- 4,83	8,52 +/- 4,20	13,00 +/- 4,61	9,36 +/- 3,48						
[h]	25,14 +/- 11,85	47,92 +/- 18,77	-	-	-	-						
[i]	-	25,11 +/- 8,42	-	-	-	-						
χ^2 /g.l	1,73 ^{ns} / 2	11	0,24 ^{ns} / 2	10,01 ^s / 2 ²	4,33 ^{ns} / 2	0,20 ^{ns} / 2						
D	-	-	-	718,02 +/- 205,27	502,24 +/- 198,22	-						
H	-	-	-	-	-	-						
E	895,45 +/- 69,50	1089,58 +/- 84,31	784,23 +/- 60,50	768,21 +/- 100,26	1027,28 +/- 120,73	759,29 +/- 139,32						
χ^2 /g.l	3,42 ^{ns} / 4	8,48 ^{ns} / 4	9,36 ^{ns} / 4	0,40 ^{ns} / 3	3,40 ^{ns} / 3	6,09 ^{ns} / 3						
Massa de nódulos secos (mg/pl)												
m	88,54 +/- 5,65	108,37 +/- 2,70	260,55 +/- 3,25	258,12 +/- 3,79	259,59 +/- 4,47	238,66 +/- 6,44						
[d]	-	-	-	20,64 +/- 9,07	-	28,18 +/- 7,25						
[h]	53,85 +/- 18,11	-	-	-	-	81,49 +/- 24,55						
χ^2 /g.l	1,92 ^{ns} / 2	7,68 ^{ns} / 3	4,34 ^{ns} / 3	1,18 ^{ns} / 2	1,33 ^{ns} / 3	1,84 ^{ns} / 1						
D	-	-	1335,67 +/- 526,51	3364,51 +/- 856,36	-	-						
H	-	-	-	-	-	-						
E	2557,74 +/- 198,52	2506,04 +/- 193,92	2794,15 +/- 322,90	2706,90 +/- 377,51	6975,76 +/- 543,06	2496,78 +/- 494,86						
χ^2 /g.l	4,90 ^{ns} / 4	5,68 ^{ns} / 4	5,15 ^{ns} / 3	2,20 ^{ns} / 3	14,96 ^s / 4 ²	2,62 ^{ns} / 3						

Continua...

TABELA 7. Herdabilidade no senso restrito (h^2) e amplo (H^2) de linhagens superiores para cruzamentos biparentais usando o conjunto restrito de gerações para os parâmetros de massa da parte aérea seca e nodulação. Os valores considerados como referência foram 3,0g para massa de parte aérea seca, 120 para número de nódulos, 300 mg para massa de nódulos secos e 4,0mg/nódulo para a relação massa de nódulos secos/número de nódulos.

	J-200 x Embrapa 133	Bossier x Embrapa 133	J-200 x Embrapa 20	Bossier x Embrapa 20	J-200 x Bossier	Embrapa 20 x Embrapa 133
..... Massa da parte aérea seca (g/pl)						
h^2	– ¹	–	0,59	0,68	0,74	0,77
H^2	–	–	0,53	0,68	0,67	0,61
P	–	–	0,11	0,18	0,11	0,30
..... Número de nódulos (n°/pl)						
h^2	–	–	–	0,65	0,49	–
H^2	0,28	0,32	0,30	0,58	0,42	0,13
P	–	–	0,03	0,24	0,05	0,04
..... Massa de nódulos secos (mg/pl)						
h^2	–	–	0,49	0,71	–	–
H^2	–	0,25	0,54	0,70	0,42	0,26
P	–	–	0,14	0,24	0,11	0,05
..... Massa de nódulos secos/Número de nódulos (mg/nódulo)						
h^2	–	–	0,39	–	–	–
H^2	–	–	0,47	0,27	0,24	0,20
P	–	–	< 0,01	–	0,08	–

¹ Nenhum modelo satisfatório foi encontrado.

4. Interação entre Espécies Vegetais e Microrganismos do Solo em Sistemas de Rotação e Sucessão de Culturas em Semeadura Direta ou Preparo Convencional do Solo (04.0.94.322-05)

Julio Cezar Franchini², Mariangela Hungria¹, Alexandre J. Cattelan¹ e Rubens J. Campo¹

4.1. Efeito de diferentes sistemas de preparo do solo e sistemas de cultivo na biota do solo

Conduziram-se avaliações com a finalidade de verificar a atividade microbiana em solos sob diferentes sistemas de cultivo. Utilizou-se um experimento de campo instalado na safra de verão de 1988/1989 em latossolo roxo distrófico, nos campos experimentais da Embrapa Soja. Foram avaliados os tratamentos de preparo de solo com arado de discos (A),

¹ Embrapa Soja

² CNPq-Embrapa Soja

semeadura direta com uso de arado cruzador a cada três anos (DC) e plantio direto contínuo (D). Dentro de cada sistema de plantio foram, ainda, avaliados os sistemas de sucessão soja/trigo (s) e rotação de culturas soja/tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo (r). As parcelas mediam 7,5 x 30,0m. O delineamento experimental foi blocos casualizados com quatro repetições. As amostragens de solo foram realizadas na safra de inverno, quinze dias após a semeadura e quinze antes do colheita do trigo. No sistema DC o arado cruzador foi utilizado 30 dias antes da semeadura do trigo. Foram coletadas 10 subamostras por parcela nas camadas de 0 a 10 e 10 a 20cm. No próprio campo as amostras foram passadas em peneira de malha de 2,0mm e guardadas em gerbox de plástico sob refrigeração a 4°C. Para a avaliação da biomassa microbiana utilizou-se o método de fumigação-extração. O carbono e o nitrogênio da biomassa foram calculados pela diferença entre as amostras fumigadas e não fumigadas utilizando um k_c de 0,33 para o carbono e 0,54 para o nitrogênio. A respiração basal (RB) e respiração induzida pelo substrato (RIS) foram determinadas utilizando subamostras de 5g com umidade corrigida para 100% pela adição de água. Nas subamostras para determinação da RIS foram adicionados 15mg/g de glucose, que foram vigorosamente agitadas para permitir a completa dispersão da glucose. As subamostras foram então colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados, com volume de 200ml e incubadas

a 25°C por 5 horas, procedendo-se, então, à determinação do CO₂.

A influência dos sistemas de semeadura na atividade e biomassa microbiana são apresentadas na Figura 2. Na primeira coleta, na camada de 0 a 10cm (superficial), o sistema DCr apresentou maior respiração basal e respiração induzida e os sistemas DCr e DCs maior carbono e nitrogênio em relação aos demais sistemas. Este comportamento pode estar relacionado à incorporação de parte do material orgânico acumulado nos últimos três anos pelo uso do arado cruzador trinta dias antes da semeadura do trigo. Na camada de 10 a 20cm (subsuperficial) os sistemas praticamente não apresentaram diferenças entre si nos parâmetros avaliados, exceto pela maior respiração basal nos sistemas Ar, As e DCr. Quando comparadas as diferentes camadas de solo, a respiração induzida e o carbono em todos os sistemas e o nitrogênio nos sistemas DCr e DCs foram menores na camada subsuperficial. A respiração basal nos sistemas Ar, As, Dr e Ds e o quociente metabólico, em todos os sistemas, foram maiores na camada subsuperficial. A maior respiração induzida e menor quociente metabólico na camada superficial demonstram que a biomassa foi potencialmente mais ativa e eficiente nesta camada. Na segunda coleta, na camada superficial, os sistemas onde ocorreu revolvimento completo (Ar e As) ou parcial (DCr e DCs) do solo apresentaram respiração basal e respiração induzida superiores aos sistemas sob semeadura direta contínua (Dr e Ds). O nitrogênio

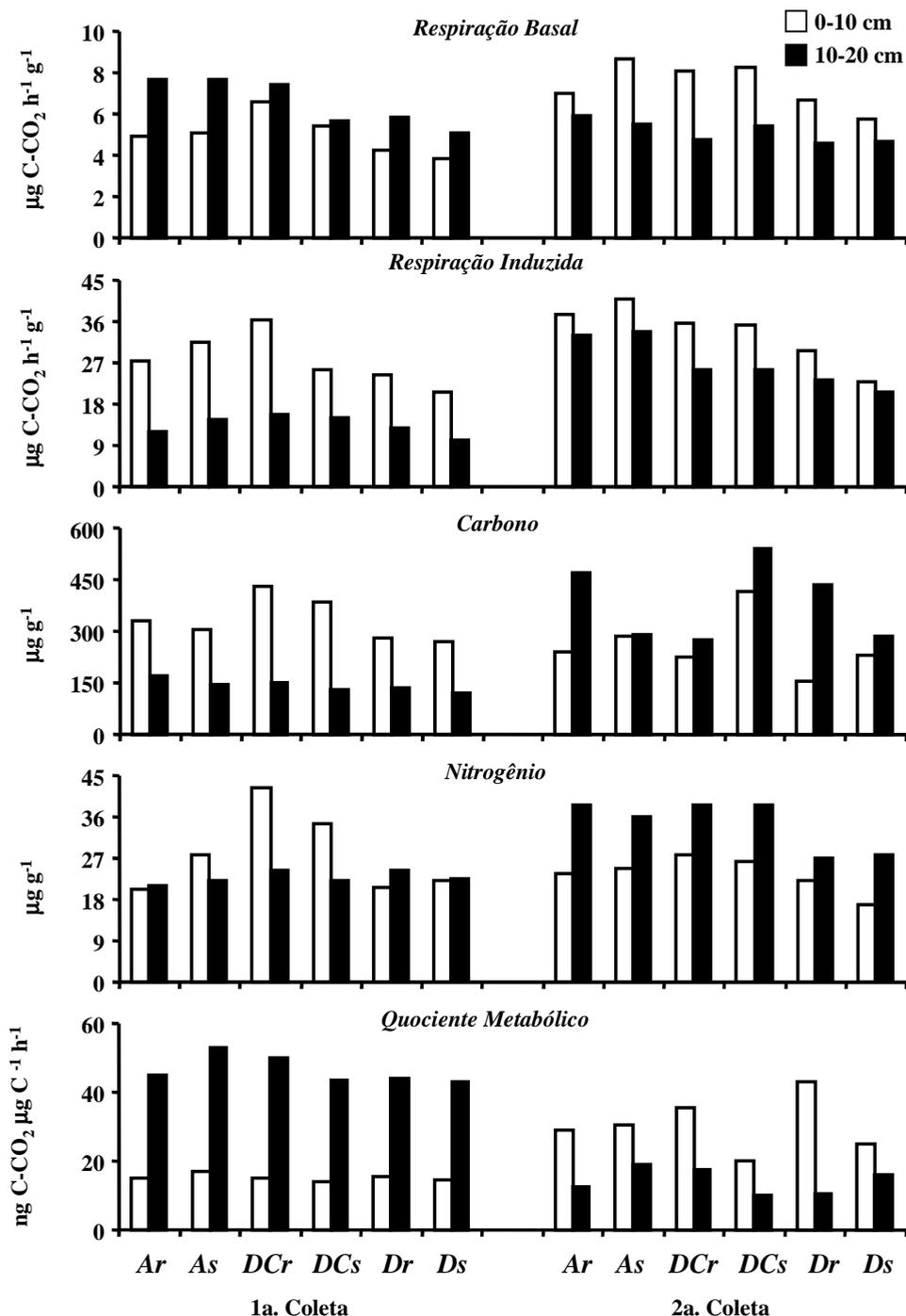


FIG. 2. Parâmetros de atividade microbiológica em sistemas de semeadura em rotação e sucessão de culturas em latossolo roxo em duas épocas de amostragem. A: arado de disco; DC: semeadura direta com arado cruzador a cada três anos; D: plantio direto; r: rotação de culturas e s: sucessão soja-trigo.

foi pouco variável entre os sistemas, enquanto o carbono foi maior no sistema DCs. O quociente metabólico tendeu a diminuir com o menor revolvimento do solo na sucessão de culturas e aumentar na rotação de culturas. Na camada subsuperficial, a respiração basal foi semelhante para todos os sistemas. A respiração induzida, por sua vez, foi maior para os sistemas Ar e As. O carbono foi bastante variável apresentando maiores valores para os sistemas Ar, DCs e Dr. O nitrogênio apresentou maiores valores para os sistemas com revolvimento completo ou parcial do solo (Ar, As, DCr e DCs) e o quociente metabólico foi pouco variável entre os sistemas.

Quando comparados os resultados da primeira com a segunda coleta pode-se observar que o comportamento da respiração basal foi invertido, ou seja, a respiração foi maior na superfície do que na subsuperfície. Para que isso ocorresse houve um pequeno aumento da respiração na camada superficial e um pequeno decréscimo na camada subsuperficial. No caso da respiração induzida foram constatados aumentos tanto na superfície quanto na subsuperfície, embora estes tenham sido maiores para a última. Para o carbono, observa-se que ele foi reduzido na camada superficial, exceto no sistema DCs; na subsuperfície houve aumento em todos os sistemas, sendo mais destacados os ocorridos nos sistemas Ar, DCs e Dr. O nitrogênio diminuiu na camada superficial nos sistemas com revolvimento parcial (DCr e DCs) e aumentou na camada subsuperficial nos sistemas

com revolvimento completo ou parcial do solo. O quociente metabólico, seguindo a tendência observada na respiração basal, também foi invertido em relação à primeira coleta, sendo maior na superfície do que na subsuperfície. Estes resultados demonstram que, na segunda coleta, o comportamento da biomassa microbiana foi totalmente alterado. Claramente, houve um aumento de atividade microbiana (maior quociente metabólico) na camada superficial devido ao aumento na respiração basal, mesmo com redução da biomassa de carbono e nitrogênio. Por outro lado, a biomassa microbiana foi aumentada na camada subsuperficial, porém, com um perfil de maior eficiência (menor quociente metabólico). Quando comparadas as coletas, a maior respiração induzida, e menor quociente metabólico na camada subsuperficial demonstram que a biomassa foi potencialmente mais ativa e eficiente na subsuperfície do solo na segunda coleta.

4.2. Efeito da inoculação com rizobactérias no crescimento de plantas de soja

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) foram testadas para a promoção do crescimento de soja e trigo por três safras consecutivas. Os experimentos a campo foram instalados em três locais no Estado do Paraná: um na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, em uma área de Latossolo Roxo, e dois na estação experimental da Embrapa Negócios Tecnológicos, em Ponta Grossa, um deles em

Latossolo Vermelho-Escuro corrigido e adubado e outro em uma área adjacente do mesmo Latossolo, porém com baixo P disponível. Para os três locais foi usado o sistema de semeadura direta. Antes da instalação do experimento, em Londrina, o solo foi corrigido com 2.200kg de calcário dolomítico e adubado com 250kg da fórmula 0-20-20 (N-P-K) e 30kg de FTE Mamboré Ponta Grossa por ha, de acordo com a análise química. O mesmo foi feito em Ponta Grossa, na área 'corrigida e adubada', com a única diferença que o solo foi corrigido com 2.900kg de calcário por ha, assim como para a área com baixo fósforo, onde, no entanto, a adubação fosfatada foi feita com fosfato de rocha da Argélia (80kg de P_2O_5 ha⁻¹). Nas safras subseqüentes, foram feitas adubações de manutenção para soja e trigo, de acordo com a recomendação. No verão, as áreas foram cultivadas com soja cv. BR 37, na safra 1998/99, e BRS 133, nas duas safras subseqüentes. No inverno, as áreas foram cultivadas com trigo; em 1999, as cultivares usadas foram BR 18, em Londrina, e Embrapa 16, em Ponta Grossa, e, em 2000, foi usada a cultivar BRS 120, nos dois locais. As sementes de ambas as espécies foram inoculadas com isolados de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP). Os isolados usados foram: *Pseudomonas cepacia* GN1201, *Ralstonia pickettii* GN2214, *Acinetobacter baumannii* LC3116, *Pseudomonas* sp. LN1116, *Pseudomonas*

sp. LN3212 e LW2301 (não identificado). As sementes de soja também foram inoculadas com *Bradyrhizobium* spp. O tratamento testemunha não recebeu RPCP. Aos 30 dias após a emergência, 10 a 20 plantas de soja por parcela foram arrancadas com o sistema radicular intacto para avaliação da nodulação, desenvolvimento da raiz e da parte aérea e de N, P e K totais no tecido. Ao final do ciclo, tanto para soja quanto para trigo, os grãos foram colhidos para avaliação do rendimento por área. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com cinco repetições e parcelas de 4,0 por 6,0m.

Os tratamentos não apresentaram efeito significativo sobre o rendimento dos grãos de soja (Tabela 8). Alguns isolados, no entanto, em algumas situações, aumentaram o teor de potássio (LC3116, LN1116 e LN3212), fósforo (GN2214 e LC3116) ou nitrogênio (GN1201, GN2214 e LW2301) no tecido ou grãos de soja. No trigo, quatro dos seis isolados testados, GN1201, LC3116, LN3212 e LW2301 aumentaram significativamente o rendimento de grãos na área de baixo fósforo, em Ponta Grossa, na safra 2000 (Tabela 9). Na média das duas safras, nas três áreas, houve um aumento no rendimento de grãos de trigo variando de 0,1 a 2,9%.

Em função desses resultados, mais testes a campo serão feitos com esses e outros isolados de RPCP em soja e em outras culturas que entram no esquema de rotação com ela.

TABELA 8. Rendimento de grãos (kg/ha), corrigidos para 13% de umidade, de plantas de soja inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento, em Londrina e Ponta Grossa, PR. Safras 1998/99 a 2000/01

Tratam.	Safr 1998/99		Safr 1999/2000			Safr 2000/01		
	Londrina	P. Grossa	Londrina	P. Grossa		Londrina	P. Grossa	
		Solo Cor.		Solo Cor.	Baixo P		Solo Cor.	Baixo P
GN1201	3.371 ^{NS}	2.918 ^{NS}	2.985 ^{NS}	1.449 ^{NS}	603 ^{NS}	2.760 ^{NS}	3.305 ^{NS}	2.241 ^{NS}
GN2214	3.379	3.272	3.096	1.680	628	2.934	2.974	2.137
LC3116	3.311	3.244	3.309	1.628	619	2.930	3.314	2.252
LN1116	3.297	2.990	2.907	1.371	631	3.003	3.375	2.197
LN3212	3.384	3.125	3.249	1.605	588	3.025	3.194	2.005
LW2301	3.626	3.010	3.248	1.649	599	2.972	3.247	2.160
Testem.	3.451	3.060	3.152	1.570	434	3.016	3.363	2.198

^{NS} As médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

TABELA 9. Rendimento de grãos (kg/ha), corrigidos para 13% de umidade, de plantas de trigo inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento, em Londrina e Ponta Grossa, PR. Safras 1999 e 2000

Tratamento	Safr 1999		Safr 2000			Médias	
	Londrina	P. Grossa Solo Corrig.	Londrina	P. Grossa Solo Corrig.	P. Grossa Baixo P	kg/ha	Aumento Rel. (%)
GN1201	3.416 ^{NS}	2.216 ^{NS}	2.669 ^{NS}	1.766 ^{NS}	1.010a [£]	2.215	1,8
GN2214	3.529	2.374	2.566	1.505	911ab	2.177	0,1
LC3116	3.534	2.232	2.705	1.636	1.038a	2.229	2,5
LN1116	3.680	2.207	2.665	1.702	915ab	2.234	2,7
LN3212	3.688	2.190	2.770	1.456	1.050a	2.231	2,6
LW2301	3.538	2.227	2.803	1.525	1.094a	2.237	2,9
Testem.	3.473	2.344	2.796	1.514	750b	2.175	-
Médias	3.551	2.256	2.711	1.586	967	2.214	2,1

[£] Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%, para cada variável estudada.

^{NS} As médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

5. Efeito Ecológico e Mutagênico do Al e Mn sobre o *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (04.1994.322-15)

Rubens J. Campo¹, Mariangela Hungria¹,
Ligia M.O. Chueire¹ e Leny M. Miura¹

Os solos brasileiros normalmente são ácidos, ricos em Al e Mn, constituindo-se num fator limitante à produção da soja e na eficiência do processo de fixação biológica do N₂ (FBN). Vários trabalhos têm sido realizados para estudar os efeitos da acidez do solo, especialmente toxidez de Al e Mn, sobre a fixação bio-

¹ Embrapa Soja

lógica do N_2 na soja. Entretanto, estudos dos efeitos desses elementos sobre a bactéria responsável pela simbiose são raros. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a diversidade genética e a eficiência de fixação biológica do nitrogênio das estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizadas nos inoculantes ao longo dos anos e dos seus isolados (mutantes ou não), obtidos pela exposição das estirpes ao Al e ao Mn. Basicamente, o trabalho consiste em expor as estirpes ao Al e ao Mn, em meio de cultura e em soluções de solos ricos em Al e Mn. Os isolados expostos ao Al e Mn, mutantes ou não, e os parentais são, então, comparados quanto às suas alterações na tolerância ao Al em meio de cultura e caso haja alterações nessa tolerância, eles são reavaliados quanto à eficiência de fixação de N_2 , diversidade genética e capacidade competitiva.

Estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram colocadas para crescer por 14 dias em extrato de solo rico em Mn (com 21,7mM de Mn), pH 5,3 e em extrato de solo sem Mn, com pH ajustado com NaOH para 6,3. Posteriormente, amostras dessas culturas foram isoladas, crescidas em meio líquido, diluídas em solução fisiológica e usadas para inocular meio de cultura sólido com distintos teores de Al, para avaliar se o Mn do extrato de solo alteraria a tolerância dessas estirpes ao Al. Os isolados da estirpe SEMIA 5079 (Tabela 10), que cresceram em extrato de solo a pH 5,3 e 6,3 apresentaram tolerância ao Al inferior à estirpe original que cresceu em meio de cultura com concentração de 650mM Al, enquanto que os isolados cres-

ceram somente até a concentração de Al de 600mM. Esses resultados mostram que o Mn não afetou a tolerância da estirpe ao Al, mas o subcultivo dessa estirpe em extrato do solo sim, indicando uma diminuição na sua tolerância original. No caso da estirpe SEMIA 5080, tanto o parental como os isolados que cresceram em distintos pH cresceram até a concentração de Al de 750mM, mostrando que a exposição dessa estirpe ao Mn do extrato de solo não foi suficiente para alterar a tolerância da estirpe ao Al. Em função desses resultados optou-se por não dar prosseguimento ao trabalho e pelas avaliações dessas estirpes e seus isolados quanto a sua eficiência de fixação de N_2 , diversidade genética e capacidade competitiva.



6. Compatibilidade de Aplicação Conjunta nas Sementes, de Fungicidas, Micronutrientes e Inoculantes, sobre a Sobrevivência do *Bradyrhizobium* e a Eficiência de Fixação Biológica do Nitrogênio (04.0.94.322-18)

Rubens José Campo¹, Mariangela Hungria¹, José Zuca Moraes¹ e Rubson N.R. Sibaldelle¹

A prática de reinoculação anual da soja é uma técnica que garante, em média, aumentos de rendimento de 4,5%. Para tanto, ela precisa ser bem feita e carece de alguns cuidados especiais para que a eficiência de fixação biológica do

¹ Embrapa Soja

TABELA 10. Número de colônias (10^6) de estirpes de *Bradyrhizobium*, que cresceram em meio sólido com diferentes concentrações de Al, após crescerem por 14 dias em extrato de solo original, pobre em Mn, pH 6,3 e rico em Mn, pH 5,3. Embrapa Soja, 2000

Estirpes	Níveis de Al em μM					
	0	450	500	550	600	650
SEMIA 5079 (original)	3,7	35,0	39,0	6,5	3,9	3,0
SEMIA 5079 (pH 6,3) I	22,0	1,4	1,9	2,4	1,9	0
SEMIA 5079 (pH 6,3) II	5,9	2,7	2,2	1,1	0,7	0
SEMIA 5079 (pH 6,3) III	6,1	5,6	2,6	1,2	3,8	0
SEMIA 5079 (pH 5,3) I	35,0	34,0	14,0	8,5	8,4	0
SEMIA 5079 (pH 5,3) II	12,0	21,0	15,0	2,5	15,0	0
SEMIA 5079 (pH 5,3) III	20,0	34,0	18,0	7,2	11,0	0

Estirpes	Níveis de Al em μM					
	0	700	750	800	850	900
SEMIA 5080 (original)	180	3,7	11,0	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 6,3) I	72	24,0	8,7	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 6,3) II	96	1,3	3,7	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 6,3) III	70	13,0	7,4	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 5,3) I	80	24,0	4,6	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 5,3) II	91	21,0	1,5	–	–	–
SEMIA 5080 (pH 5,3) III	39	11,0	3,0	–	–	–

N_2 (FBN) seja máxima. A recomendação atual consiste em se umedecer as semente com 300ml de água açucarada a 10%/50kg de semente, para melhor aderir o inoculante nas sementes e, em seguida, aplicar 500g/50 kg de inoculante de boa qualidade. A aplicação de fungicidas e micronutrientes nas sementes de soja imediatamente antes da inoculação faz com que a bactéria fique em contato direto com esses produtos, reduzindo a sua população na semente. Por consequência, ocorre menor competição da bactéria da semente, que foi inoculada, com as naturalizadas do solo, reduzindo a nodulação da soja na coroa

do sistema radicular e a eficiência do processo de FBN. Atualmente, existe uma variedade muito grande de produtos fungicidas, micronutrientes e inoculantes recomendados para a soja, mas pouco se conhece da compatibilidade e das interações que ocorrem na sua aplicação conjunta. Assim, o trabalho objetiva conhecer a intensidade dos efeitos tóxicos dos diferentes fungicidas e micronutrientes sobre a bactéria, quando aplicados em conjunto nas sementes e o de buscar alternativas de aplicação destes produtos de forma a não reduzir a população da bactéria nas sementes e, por consequência, a eficiência de FBN.

Os diferentes princípios ativos dos fungicidas, contato + sistêmico, recomendados para a soja e as diferentes fontes de micronutrientes e os inoculante serão testadas isoladamente e em conjunto, para compatibilizar o seu uso. Paralelamente, outras formas, doses e épocas de aplicação de micronutrientes serão testadas, como tecnologia alternativa, ao método de aplicação de micronutrientes atualmente utilizado. A aplicação dos produtos fungicidas e/ou micronutrientes nas sementes será de acordo com a metodologia recomendada, ou seja, imediatamente antes da inoculação das sementes. A eficiência da FBN será determinada pela avaliação da nodulação, do número e da massa de nódulos secos, da massa seca da parte aérea, do N na parte aérea, do N nos grãos e da produtividade de grãos.

Inoculantes - Nos últimos anos, além dos inoculantes turfosos, outros inoculantes estão disponíveis no mercado para uso pelos produtores de soja. Vinte e quatro inoculantes foram avaliados quanto a população de células de *Bradyrhizobium*, em dois meios de cultura, ágar manitol e meio seletivo. Todos os inoculante avaliados apresentaram, em novembro/dezembro, população de *Bradyrhizobium* superior a 10^8 células/g ou ml de inoculante, conforme exigência da atual legislação. A qualidade dos novos inoculantes disponíveis no mercado foi, ainda, comparada com o inoculante padrão turfoso a campo, em dois solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Em Terra Roxa do Oeste, verificou-se que a inoculação com 500

g de inoculante turfoso (380 000 células/semente) proporcionou nodulação de 20 nódulos por planta. A inoculação com 120 000 células e a aplicação de 200kg de N mineral reduziram o número de nódulos, em relação à inoculação padrão, em 60% e 50%, respectivamente. Os inoculantes Cell Tech e Urulec apresentaram número e massa de nódulos superiores ao padrão turfoso, enquanto os outros inoculantes apresentaram nodulação inferior a esse padrão. Os demais parâmetros como massa seca de plantas, N na massa seca e N nos grãos, bem como rendimento de grãos não foram obtidos, uma vez que o ensaio foi danificado por coelhos. Resultados similares quanto à nodulação foram observados em Vera Cruz do Oeste. Nesse local, os inoculantes Cell Tech, Urulec e Histick apresentaram desempenho igual ou superior ao padrão turfoso. Por se tratar de um solo com muito material orgânico e, por conseqüência, com alta disponibilidade de N, os dados obtidos de nodulação não refletiram na eficiência do processo de FBN e do rendimento de grãos, não havendo correlação entre os parâmetros nodulação, rendimento de grãos e N total nos grãos. Verificou-se, ainda, nesses dois locais, que a inoculação com 120 000 células de *Bradyrhizobium* apresentou número de nódulos bem inferior à inoculação padrão recomendada, 500g de inoculante turfoso por 50kg de semente.

Micronutrientes Mo e Co - Assim como na safra anterior, nessa safra alguns micronutrientes foram testados quanto aos seus efeitos sobre a eficiência de FBN e no rendimento da soja, em

solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Os resultados mostraram que o número de nódulos só foi reduzido pela aplicação de N, e que nenhuma das fontes de Mo testadas apresentou número de nódulos diferente da testemunha inoculação padrão, que foi igual à testemunha sem inoculação, por se tratar de um solo com população estabelecida. Com relação à massa de nódulos secos, verifica-se que todas as fontes de Mo apresentaram valores iguais à testemunha inoculação padrão e superiores ao tratamento que recebeu N e ao tratamento sem inoculação. Para o parâmetro N total nos grãos, observou-se que, à exceção da fonte de Mo, CoMol-BASF, que apresentou o maior valor, todas as fontes de Mo (molibdato de amônio, molibdato de sódio, ácido molíbdico, trióxido de Mo, cofermol pó, MoCo e nutrimins, apresentaram valores iguais à testemunha 200kg de N e superiores aos tratamentos que não receberam Mo, sem inoculação e inoculação padrão. Esses resultados mostram, dessa forma, a importância do Mo para o processo de FBN. Para o rendimento de grãos, verificou-se que todos os tratamentos que receberam Mo e N foram superiores às testemunhas com e sem inoculação, mas sem Mo. Inclusive, verificou-se que algumas fontes de Mo testadas (molibdato de amônio, ácido molíbdico, trióxido de Mo, MoCo, nutrimins e CoMol) mostraram-se melhores do que a testemunha com 200kg de N. Dois outros experimentos foram realizados, em Terra Roxa e Vera Cruz do Oeste, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*, para estudar o

efeito de fontes de Mo e Co na sobrevivência do *Bradyrhizobium*. Verificou-se que a adição de Mo + Co, juntamente com a água açucarada antes da inoculação, reduziu o número de nódulos para todos os micronutrientes testados para os dois locais, exceto para o produto cofermol pó. Essas reduções foram superiores a 33% e 24%, respectivamente, para Terra Roxa e Vera Cruz do Oeste. Pela importância do Mo e Co para a FBN e para a soja e devido aos problemas que a aplicação desses nas sementes causa para a bactéria, experimentos adicionais foram conduzidos visando buscar alternativas de fornecer Mo. Dois experimentos de aplicação de Mo foram instalados para determinar a dose e a época mais adequada para aplicação via foliar. O Co sempre foi fornecido em dose única de 2,5g/ha, via foliar. Em um dos experimentos, a aplicação do Mo na semente foi comparada com doses de Mo aplicada aos 25 dias após emergência. Verificou-se que a aplicação de 20g de Mo nas sementes apresentou resultados de rendimento de grãos e N total nos grãos igual a 20g e 40g de Mo aplicados via foliar. Por outro lado, a aplicação do Mo foliar na floração plena não foi tão efetiva quanto a aplicação na semente, mostrando que a aplicação nessa época foi muito tarde, prejudicando a eficiência da FBN e o rendimento da soja. Diversas outras alternativas para fornecer o Mo para a soja e a eficiência da FBN foram testadas em outro experimento, em comparação com a aplicação nas sementes (Tabela 11). Pelos resultados apresentados, verifica-se que a falta de Mo afetou o peso de 100

TABELA 11. Efeito de modos de aplicação de Mo no peso de 100 sementes, N total nos grãos e rendimento de grãos de soja, cultivar BR 37. Experimento conduzido em Londrina, PR, safra 98/99, solo LRD, com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Embrapa Soja. 1999

Tratamentos	100 sementes	N (kg/ha)	Rend. (kg/ha) ⁴
SM (7,5 µg de Mo/g) - sem inoculação	14,9	223	3402
SM - sem inoculação + (Co + Mo) semente	16,8	257	3773
SM - IP ¹ + 200 kg N	15,6	262	3776
SM - Inoculação padrão (IP)	14,6	224	3410
SM - IP + Co na semente	15,1	222	3387
SM - IP + Mo na semente	16,9	243	3729
SM - IP + (Mo + Co) ² na semente	16,7	246	3847
SM - IP + (Mo + Co), herbicida pós	17,3	247	3895
SM - IP + (Mo + Co), baculovírus	16,7	237	3810
SM - IP + (Mo + Co), inseticida	16,3	231	3686
SP (0,73 µg de Mo/g) + IP + (Co + Mo) semente	16,2	239	3659
SR (13,3 µg de Mo/g) + IP + (Co + Mo) semente	16,8	263	3769
SR + IP	15,9	237	3491
CV (%)	2,6	8,5	8,0
DMS (5%) ³	0,34	16,8	239

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g de inoculante turfoso (50kg semente), estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, população de células de $3,0 \times 10^{10}$ /g inoculante.

² $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5g de Co + $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20g de Mo por ha (80kg de semente).

³ DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos cujo valor é superior aos valores dessa linha para cada coluna, indica que os tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t".

⁴ Valores corrigidos para 13% de umidade.

sementes, o N total nas sementes e o rendimento de grãos. Confirmando os resultados obtidos na safra 1987/88, verificou-se, ainda, que a aplicação do Mo e Co nas sementes pode ser substituída pela aplicação foliar, 25 dias após emergência, sem aumento adicional de custo porque ela pode ser efetuada juntamente com o herbicida em pós-emergência, baculovírus ou inseticida para lagarta. Outra alternativa que vem sendo testada, visando suprir a deficiência de Mo para a FBN nos primeiros estádios de desenvolvimento da soja, é através do

uso de sementes ricas em Mo. Para isso, doses crescentes de Mo (0, 400, 800 e 1600kg/ha) foram aplicadas 20 dias após floração (R2). Confirmando resultados anteriores, a aplicação de altas doses de Mo nos estádios reprodutivos da planta não influenciam o rendimento de grãos e os teores de N nos grãos, em relação à testemunha sem aplicação de Mo. Nessa época, a aplicação foliar de Mo na soja tem o objetivo de aumentar o teor de Mo nas sementes, como ficou demonstrado para a cultivar BR 16. Nessa safra, não só a BR 16, mas também, as cultivares

BR 37, BRS 133 e EMBRAPA 48 foram avaliadas. Verificou-se que, de modo geral, as cultivares BR 16, BR 37, BRS 133 e EMBRAPA 48 apresentaram concentrações de Mo (mg/g semente) bastante similares, em relação aos níveis de Mo aplicados. Em média, as cultivares apresentaram teores de Mo na semente de 2, 9, 17 e 30mg/g semente, respectivamente, para as doses de Mo aplicadas de 0, 400, 800 e 1600g Mo/ha. Sabe-se que, além do nível de Mo a aplicar, é muito importante conhecer a época mais adequada para fazê-lo, visando minimizar os custos de enriquecimento das sementes. Os resultados mostram que os teores de Mo nas sementes, independente da fonte, foram similares a partir da floração plena (R2/R3), até 30 dias após a primeira aplicação. O menor teor de Mo (20,0mg/g semente) encontrado para a aplicação 10 dias após a floração plena se deve à 48,6mm de chuva que ocorreu no dia seguinte à aplicação. A alternativa de aplicação de Mo, para enriquecimento de sementes, via aplicação de inseticidas foi também avaliada. Verifica-se que a aplicação de Mo juntamente com o inseticida Monocrotofós melhorou o desempenho desse inseticida. O mesmo não ocorreu com o Endossulfan. Por outro lado, verifica-se que, independente da aplicação de inseticida, os teores de Mo nas sementes foram similares com a aplicação de 800g de Mo/ha. Devido a problemas com amarelecimento de folhas pela aplicação de 5g/ha de Co, o experimento foi instalado reduzindo-se a dose desse elemento. Pelos resultados obtidos, verifica-se que 50% da dose recomendada

(2,5g/ha) aumentou o rendimento de grãos em 3,0% e 1,8%, em relação ao tratamento que recebeu apenas Mo e o que recebeu Mo + 5,0g/ha de Co, respectivamente. Assim como nos anos anteriores, outras alternativas de aplicação de Mo e Co na semente foram testadas nessa safra para avaliação dos efeitos desses nutrientes. Em Londrina, PR, em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, foi realizado um experimento para testar outros métodos de aplicação de Mo, em comparação com a aplicação na semente. Verificou-se se que o Co aplicado sozinho influencia pouco o rendimento de grãos (4,5%), quando as sementes utilizadas continham baixo teor de Mo (SN = 0,73 μ g/g semente), mas quando sementes mais ricas em Mo foram utilizadas (SR = 13,3 μ g/g semente) esse aumento de rendimento passou para 7,5%. Pelos resultados apresentados (Tabela 12), verifica-se, ainda, que o Mo, quando aplicado sozinho, com o uso de sementes com baixo Mo (SN), aumentou o rendimento da soja em 48,7%, quando aplicado via semente e em 63,1%, quando aplicado via foliar. A comparação do método de aplicação de Co + Mo via semente e foliar mostrou que os aumentos de rendimento, em relação à testemunha sem Co + Mo (SN) foram similares, 57,4% para aplicação via semente e 56,3% via foliar, demonstrando, assim, que é possível substituir a aplicação do Mo na semente pela pulverização foliar. Outra alternativa para se aplicar Mo nas sementes sem afetar a sobrevivência da bactéria testada foi através do uso de sementes ricas em Mo. Os resultados

TABELA 12. Efeito da aplicação de Co e Mo, via semente ou foliar, em sementes de soja, cv BR 16, enriquecidas de Mo e da inoculação da soja na massa de nódulos secos, peso de 100 sementes, N total nos grãos e rendimento de grãos. Londrina, PR, safra 1998/99, solo LRd. Embrapa Soja. 1999

Tratamentos	Nod. g/10 pl	100 sem. (g)	N kg/ha	Rend. kg/ha ³
SN (0,73 µg/g)	0,50	13,3	125	2314
SN + Co ¹	0,43	13,2	133	2419
SN + Mo ¹	0,33	16,3	203	3441
SN + Mo (foliar)	0,48	16,6	237	3774
SN + Co + Mo	0,39	16,5	216	3643
SN + Co + Mo (foliar)	0,41	16,6	231	3618
SR (13,3 µg/g)	0,46	15,3	184	3109
SR + Co	0,39	15,0	194	3341
SR + Mo	0,42	15,8	224	3602
SR + Co + Mo	0,43	16,9	227	3674
CV (%)	35,6	4,7	9,4	9,6
DMS 5% ²	0,12	0,59	14,6	254

¹ As doses de Co e Mo foram respectivamente de 5,0g de Co e 20g de Mo por ha.

² DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos cujo valor é superior aos valores dessa linha para cada coluna, indica que os tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t".

³ Valores corrigidos para 13% de umidade.

observados para a cv. BR 16 mostram que as sementes com maiores teores de Mo apresentaram, em média, valores de N na massa seca da parte aérea, peso de 100 sementes, N total nos grãos e rendimento de grãos crescentes em relação aos teores de Mo nas sementes. Respostas expressivas são verificadas com aplicação de Mo via semente quando se usa sementes pobres em Mo. À medida que se aumenta os teores de Mo nas sementes, as respostas à aplicação de Mo são menos significativas. O maior rendimento de grãos foi obtido com o uso de sementes ricas em Mo com adição complementar de 10g de Mo, que resultou em 2,6% de aumento de rendimento em relação à testemunha, semente pobre em

Mo mais 20g de Mo. Resultados similares foram observados para a cv. conquista, entretanto, com rendimentos inferiores por ser uma cultivar não recomendada para essa região. Em ambas as cultivares, verificou-se que os teores de Mo nas sementes não foram afetados em função da riqueza das sementes em Mo e da de Mo complementar na semeadura.

Fungicidas - A avaliação do efeito tóxico dos fungicidas recomendados para o tratamento de sementes sobre o *Bradyrhizobium* foi realizada em condições de campo, em dois solos sem população estabelecida da bactéria, Terra Roxa e Vera Cruz do Oeste (Tabela 13). Verifica-se que o tratamento testemunha sem inoculação apresentou baixo núme-

TABELA 13. Efeito de fungicidas na nodulação da soja, cv BR 37, solos de Terra Roxa (arenoso) e Vera Cruz do Oeste (argiloso), ambos com população de *Bradyrhizobium* inferior a $\leq 1 \times 10^{-2}$ células/g de solo. Embrapa Soja. 1999

Tratamentos - Fungicidas ¹	Terra Roxa		Vera Cruz Oeste	
	Nº	(%) red.	Nº	(%) red.
Testemunha sem inoculação	1	–	5	–
Inoculação padrão (IP) ²	23	0	34	0
IP + Benomyl + Captan	6	74	26	24
IP + Benomyl + Thiram	5	78	27	21
IP + Benomyl + Tolyfluanid	5	78	25	27
IP + Carbendazin + Captan	11	52	33	3
IP + Carbendazin + Thiram	5	78	28	18
IP + Carbendazin + Tolyfluanid	4	83	26	24
IP + Carboxin + Thiram	14	39	29	15
IP + Difenconazole + Thiram	13	43	30	12
IP + Thiabendazole + Captan	3	87	25	27
IP + Thiabendazole + Thiram	7	70	23	32
IP + Thiabendazole + Tolyfluanid	5	78	32	6
IP + Tegram + Co + Mo	3	87	20	41
IP + Co + Mo	21	9	21	38
CV (%)	53		30	
DMS ³ 5%	3,6		6,2	

¹ Doses recomendadas de acordo com Comunicado Técnico nº 58 Embrapa Soja, 1997.

² 300ml de água açucarada mais 500g de inoculante turfoso (50kg semente), estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, população de células de $3,0 \times 10^{10}$ /g inoculante.

³ DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos, cujo valor é superior aos valores dessa linha, para cada coluna, indica que os tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t".

ro de nódulos em ambos os locais. Por outro lado, a testemunha inoculada (IP) teve nodulação de 23 e 34 nódulos/planta, respectivamente, para Terra Roxa e Vera Cruz do Oeste, comprovando a boa qualidade do inoculante usado. Dentre as misturas de fungicidas testadas, as que menos reduziram a nodulação foram: Carboxin + Thiram e Difenconazole + Thiram em Terra Roxa e Carbendazin + Captan, Thiabendazole + Tolyfluanid, Difenconazole + Thiram, Carboxin + Thiram e Carbendazin + Thiram em Vera

Cruz do Oeste. As demais misturas causaram reduções na nodulação superiores a 50% em Terra Roxa e 20% em Vera Cruz do Oeste. Por ser um solo arenoso, os efeitos dos fungicidas foram mais acentuados em Terra Roxa. Os resultados de rendimento de grãos não são apresentados por não refletirem os resultados de nodulação, devido aos altos teores de N, proveniente da decomposição da grande quantidade de material orgânico que esse solo possuía, por ser de primeiro cultivo. Mas, em um solo com bai-

xo N, essa diferença na nodulação iria, provavelmente, influir na produtividade da soja.

Interação inoculante, fungicida e micronutriente - Logicamente que seria impossível estudar a interação entre todos os inoculantes, fungicidas e micronutrientes testados individualmente, portanto, algumas interações foram testadas em dois locais. Em Terra Roxa, solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*, a inoculação padrão foi comparada com alguns inoculantes de mercado na presença dos micronutrientes (Co + Mo) mais

o fungicida Tegram (Tabela 14) e fungicida Benomyl + Thiram (Tabela 15). Os resultados mostram que a nodulação foi muito afetada pela aplicação dos micronutrientes Co e Mo e da aplicação do fungicida Tegram (Thiabendazole + Thiram) nas sementes, causando reduções na nodulação superiores a 77% (Tabela 14). Similares resultados foram obtidos quando o Benomyl + Thiram foi usado no lugar do Tegram (Tabela 15). Experimento similar foi instalado em solo sem população estabelecida de Vera Cruz só que com apenas o fungicida Tegram

TABELA 14. Efeito de micronutrientes, fungicidas e inoculantes, aplicados em conjunto nas sementes de soja, cultivar BR 37, no número e massa de nódulos secos obtidos em solo de primeiro ano de cultivo de Terra Roxa do Oeste, PR, safra 1998/99. Resultados médios de seis repetições. Embrapa Soja, 1999

Tratamentos	Nodulação por planta	
	Número	Massa (g)
Sem inoculação	3	2
Inoculação padrão (IP) ¹	53	20
IP + (Co + Mo)	36	16
IP + Tegram	7	3
IP + Co + Mo + Tegram	6	3
I com Cell tech + Co + Mo + Tegram	12	5
I com Rizo-liq + Co + Mo + Tegram	5	3
I com Biosoja liq. + Co + Mo + Tegram	6	3
I com Geratec + Co + Mo + Tegram	3	2
I com Urulec + Co + Mo + Tegram	9	4
I com Histick + Co + Mo + Tegram	4	2
CV (%)	40,1	58,4
DMS ⁴ 5%	4,3	2,7

¹ 300ml de água açucarada (10%) mais 500g (por 50kg de semente) de inoculante turfoso, estirpes (SEMIA 587 + SEMIA 5019), com uma população de $3,0 \times 10^{10}$.

^{2,3} Tegram e Benomyl + Thiram, respectivamente, nas doses recomendadas conforme comunicado técnico n.º 58 da Embrapa Soja, 1997.

⁴ DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos cujo valor é superior aos valores dessa linha, para cada coluna, indica que os tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 15. Efeito de micronutrientes, fungicidas e inoculantes, aplicados em conjunto nas sementes de soja, cultivar BR 37, no número de nódulos obtidos em solo de primeiro ano de cultivo de Terra Roxa do Oeste, PR, safra 1998/99. Resultados médios de seis repetições. Embrapa Soja, 1999

Tratamentos	Nodulação por planta	
	Número	% redução
Sem inoculação	3	–
Inoculação padrão (IP) ¹	53	0
IP + (Co + Mo)	36	32
IP + Benomyl + Thiram	5	91
IP + Co + Mo + Benomyl + Thiram	5	91
I com Turfal liq. + Co + Mo + Benomyl + Thiram	6	89
I com Cell tech + Co + Mo + Benomyl + Thiram	13	76
I com Rizo liq + Co + Mo + Benomyl + Thiram	4	93
I com Biosoja liq. + Co + Mo + Benomyl + Thiram	4	93
I com Geratec + Co + Mo + Benomyl + Thiram	4	93
I com Urulec + Co + Mo + Benomyl + Thiram	3	94
I com Histick + Co + Mo + Benomyl + Thiram	2	96
CV (%)	44,1	–
DMS ⁴ 5%	4,1	–

¹ 300ml de água açucarada (10%) mais 500g (por 50kg de semente) de inoculante turfoso, estirpes (SEMIA 587 + SEMIA 5019), com uma população de $3,0 \times 10^{10}$.

^{2,3} Tegram e Benomyl + Thiram, respectivamente, nas doses recomendadas conforme comunicado técnico nº 58 da Embrapa Soja, 1997.

(Thiabendazole + Thiram). Por ser um solo mais argiloso, os efeitos negativos da aplicação conjunta de Co + Mo + Tegram, antes da inoculação, foram inferiores, entretanto, sempre causando reduções na nodulação superiores a 56%. Experimento adicional foi instalado nesses dois locais, visando estudar o efeito dos micronutrientes e fungicidas sobre a mortalidade das células do inoculante padrão turfoso (Tabela 16). Verificou-se

que o cofermol sozinho não reduziu a nodulação da soja mas, quando em presença dos fungicidas Benomyl + Thiram e Tegram, as reduções na nodulação foram em torno de 90%, no solo de Terra Roxa, e acima de 40%, no solo de Vera Cruz do Oeste. Mostrando que quando se aplicam os fungicidas e os micronutrientes, juntos com o inoculante nas sementes, o efeito tóxico na bactéria, reduzindo a nodulação é ainda maior.

TABELA 16. Efeito de fungicidas, micronutrientes e da inoculação na nodulação da soja, cv BR 37, solos de Terra Roxa (arenoso) e Vera Cruz do Oeste (argiloso), ambos com população de *Bradyrhizobium* inferior a $\leq 1 \times 10^{-2}$ células/g solo. Embrapa Soja. 1999

Tratamentos	Terra Roxa		Vera Cruz do Oeste	
	Nº	(%) red.	Nº	(%) red.
Sem Inoculação (SI)	3	–	5	–
Inoculação Padrão ¹ (IP)	53	0	34	0
IP + Co + Mo ² - Mol. sódio	36	32	21	38
IP + Cofermol	50	6	33	3
IP + Beno. + Thiram	5	91	27	21
IP + Cofermol + Beno. + Thiram	6	89	12	65
IP + Tegram	7	87	23	32
IP + Co + Mo + Tegram	6	89	20	41
IP + Cofermol + Tegram	4	92	20	41
CV (%)	58	–	37	–
DMS 5% ³	8,2	–	6,2	–

¹ 300ml de água açucarada mais 500g de inoculante turfoso (50kg semente), estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, população de células de $3,0 \times 10^{10}$ /g inoculante.

² $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5g de Co + $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20g de Mo por ha (80kg de semente).

³ DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos cujo valor é superior aos valores dessa linha para cada coluna, indica que os tratamentos são diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t".

