

RESULTADOS DE PESQUISA DA EMBRAPA SOJA - 2002

Microbiologia de Solos

PSO
99r
03

r-2008.01338

Resultados de pesquisa da
2003 LV - 2008.01338



44701-1





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Roberto Rodrigues

Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimarzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Sérgio Fausto

Dietrich Gerhard Quast

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa

Herbert Cavalcante de Lima

Gustavo Kauark Chianca

Diretores Executivos

Embrapa Soja

Caio Vidor

Chefe Geral

José Renato Bouças Farias

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Alexandre José Cattelan

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

Norman Neumaier

Chefe Adjunto de Administração

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:

Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja

Caixa Postal 231 - 86001-970 - Londrina, PR

Telefone (43) 3371-6000 Fax (43) 3371-6100

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê de Publicações da Embrapa Soja



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1516-781X
Agosto, 2003*

Documentos216

Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja - 2002

Microbiologia de Solos

Organizado por:

**Clara Beatriz Hoffmann-Campo
Odilon Ferreira Saraiva**

**Londrina, PR
2003**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na¹

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231

86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6000

Fax: (43) 3371-6100

<http://www.cnpso.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpso.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *José Renato Bouças Farias*
Secretária executiva: *Clara Beatriz Hoffmann-Campo*
Membros: *Álvaro Manuel Rodrigues Almeida*
Geraldo Estevam de Souza Carneiro
Ivan Carlos Corso
José de Barros França Neto
Léo Pires Ferreira
Manoel Carlos Bassoi
Norman Neumaier
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Supervisor editorial: *Odilon Ferreira Saraiva*
Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*
Editoração eletrônica: *Neide Makiko Furukawa*

1ª Edição

1ª impressão 08/2003: tiragem: 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2002:
microbiologia de solos / organizado por Clara Beatriz
Hoffmann-Campo, Odilon Ferreira Saraiva. - Londrina:
Embrapa Soja, 2003.
90p. : il. ; 21cm. - (Documentos / Embrapa Soja,
ISSN 1516-781X; n.216)

1. Biologia do solo. 2. Microbiologia do solo. 3. Soja.
I. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz (Org.) II. Saraiva, Odilon
Ferreira (Org.). III. Título. IV. Série.

CDD 631.46

© Embrapa 2003

Apresentação

“Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja” é uma publicação anual, onde os pesquisadores relatam os principais resultados e avanços obtidos, no último ano, em seus projetos de pesquisa e de transferência de tecnologia em soja, girassol e trigo. Tem como principal objetivo registrar nossa memória técnica e informar pesquisadores, professores, assistência técnica e demais interessados sobre o andamento das pesquisas durante a última safra. Muitos desses resultados são oriundos de trabalhos em andamento e, portanto, ainda não conclusivos. Sendo assim, a utilização das informações contidas nesta publicação deve ser feita com cuidado. As tecnologias prontas para utilização à campo são discutidas em reuniões específicas e repassadas para a assistência técnica e para os produtores rurais, como Sistema de Produção ou outras publicações das séries Documentos ou Circular Técnica, as de caráter emergencial são divulgadas na forma de Comunicado Técnico e os resultados de interesse para a comunidade científica são publicados em revistas periódicas especializadas, de alcances nacional e internacional.

Para facilitar o manuseio, a publicação foi dividida em nove volumes, contemplando os resultados dos projetos de uma área específica de conhecimento ou de áreas correlatas. O presente volume apresenta os resultados obtidos em 2002, na área de Microbiologia de Solos.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

Sumário

1	MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO N ₂ (FBN) EM SOJA PELO AUMENTO DA COMPETIÇÃO E EFICÁCIA DA BACTÉRIA INOCULADA, EM RELAÇÃO À NATURALIZADA NO SOLO	7
1.1	Avaliação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> , inoculantes microbianos e métodos de inoculação, em diferentes regiões do Brasil (04.2001.340-01)	8
1.2	Compatibilidade de aplicação de inoculantes com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.2001.340-02)	20
2	ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA	39
2.1	Identificação de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> / <i>B. elkanii</i> mais eficientes e competitivas para a cultura da soja e avaliação das respostas à reinoculação em áreas com populações estabelecidas distintas de <i>Bradyrhizobium</i> (04.2001.338-01)	42
2.2	Desempenho simbiótico de cultivares de soja e busca de marcadores moleculares relacionados à fixação biológica do nitrogênio (04.2001.338-02)	59
2.3	Microrganismos associativos promotores do crescimento de soja (04.2001.338-03)	75
3	USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA MAXIMIZAR A CONTRIBUIÇÃO DOS RIZÓBIOS FIXADORES DE NITROGÊNIO E DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES: CARACTERIZAÇÃO	

DA DIVERSIDADE SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS À INOCULAÇÃO	81
3.1 Diversidade microbiana e de <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i> em solos cultivados com feijoeiro e soja sob os sistemas de plantio direto e plantio convencional (02.2001.327-03)	82

MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO N₂ (FBN) EM SOJA PELO AUMENTO DA COMPETIÇÃO E EFICÁCIA DA BACTÉRIA INOCULADA, EM RELAÇÃO À NATURALIZADA NO SOLO

Nº do Projeto: 04.2001.340 Líder: Rubens José Campo

Nº de subprojetos que compõem o projeto: 05

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste

A soja é uma das leguminosas mais eficientes no processo de fixação do N₂. No Brasil, as taxas de fixação biológica têm sido estimadas entre 70% a 85% do N acumulado pelas plantas, representando fixação de 109 a 250 kg de N/ha. A eficiência do processo de fixação biológica do N₂ (FBN) depende de vários fatores inerentes à soja e à bactéria. Fatores físicos do solo, temperatura, umidade e luz solar, assim como fatores genéticos e nutricionais ligados à planta, à eficiência e à capacidade das estirpes de competir e formar nódulos ou, ainda, quaisquer fatores que possam reduzir a população da bactéria na semente afetam negativamente a fixação do N. Os trabalhos de pesquisa de soja, no Brasil, têm desenvolvido novas tecnologias de cultivo de soja, com aumentos sucessivos de rendimento, implicando em necessidades crescentes de nitrogênio (N). Níveis de rendimento de soja de 5000 kg/ha (83 sacos/ha) têm sido obtidos, com bastante freqüência, em trabalhos de pesquisa, comprovando a capacidade produtiva das cultivares ora disponíveis. Entretanto, em lavouras comerciais, raramente a soja produz mais que 4000 kg (66 sacos/ha). Sistemáticamente, tem-se observado que baixos rendimentos de soja estão relacionados com baixos teores de N nos grãos, agravando o problema do baixo teor de proteína dos grãos destinados à indústria de farelo. Assim, torna-se indispensável a busca de novas linhas de pesquisa para aumentar a nodulação, a eficiência da FBN, o rendimento de grãos e os teores de proteína nos grãos. Nesse contexto, este projeto, constituído de cinco subprojetos, tem os seguintes objetivos: 1) avaliar e selecionar estirpes de *Bradyrhizobium* mais eficientes

entes para a FBN, em diversas regiões produtoras de soja; 2) determinar a competitividade das estirpes na infectividade e ocupação dos nódulos da soja por método sorológico e PCR; 3) identificar e avaliar métodos e técnicas alternativos de inoculação que possibilitem a maximização do fornecimento de N pelo processo de FBN; 4) desenvolver e avaliar inoculantes comerciais que favoreçam uma maior população e sobrevivência da bactéria sementes, aumentando a nodulação e a eficiência da FBN; 5) avaliar, entre os inoculantes comerciais existentes no mercado, quais são os mais compatíveis com os defensivos agrícolas e micronutrientes recomendados para a soja, em aplicação conjunta na semente; 6) identificar e avaliar métodos alternativos de aplicar micronutrientes nas sementes que não reduzam a nodulação e a eficiência da FBN, aumentando os teores de proteína e o rendimento de grãos.

1.1 Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação, em diferentes regiões do Brasil (04.2001.340-01)

Rubens J. Campo; Mariangela Hungria; Leny M. Miura; Everson Laureto;
Rubson N.R. Sibaldelle; José Z. Moraes; Miguel Pereira de Souza

A reinoculação da soja proporciona o aumento da população da bactéria introduzida nas sementes da soja, favorecendo a competição da bactéria introduzida com a naturalizada. Isso proporciona melhor nodulação primária da coroa do sistema radicular da soja e melhores fixação biológica do nitrogênio (FBN) do ar do solo e rendimento da soja. A maior população de células nas sementes pode ser conseguida pela inoculação das sementes com estirpes mais eficientes e competitivas, pelo uso de inoculante de melhor qualidade ou pelo uso de técnicas de inoculação que garantam maior população e sobrevivência das células nas sementes. Assim, o objetivo do presente trabalho consiste em: (a) avaliar e selecionar a melhor estirpe de *Bradyrhizobium* para compor os inoculantes comerciais, (b) avaliar os inoculantes comerciais, e (c) identificar e avaliar técnicas alternativas de inoculação

que possam promover um maior número de células nas sementes, melhor nodulação e FBN e maiores rendimentos de soja. Os experimentos para atender esses objetivos foram realizados em condições de campo, em blocos ao acaso em seis repetições e os parâmetros avaliados para comparar os diferentes tratamentos foram número e massa de nódulos secos, teores de N nos grãos, N total nos grãos e rendimento de grãos.

As quatro estirpes em uso nos inoculantes (SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080) foram testadas entre si e comparadas com os pares eficientes obtidos em estudos anteriores e as testemunhas sem inoculação e com 200 kg de N. Visando atender o primeiro objetivo do trabalho, as quatro recomendadas foram testadas isoladas e também comparadas com as combinações SEMIA 587 + SEMIA 5019, SEMIA 5079 + SEMIA 5080 + SEMIA 587 + SEMIA 5080 e os tratamentos testemunhas sem inoculação e aplicação de 200 kg de N/ha. O trabalho foi repetido em dois solos de população estabelecida de Londrina, PR (Tabela 1.1) e Ponta Grossa, PR (Tabela 1.2) e em dois solos sem população estabelecida de Jaciara, MT (Tabela 1.4) e Lucas do Rio Verde, MT (Tabela 1.3). Em Londrina, a reinoculação com as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 apresentou o melhor rendimento de grãos (3.383 kg/ha), ou seja, 21% a mais que a testemunha com N e 9% superior ao tratamento sem inoculação. Em Ponta Grossa, o maior rendimento foi obtido com o tratamento inoculação com a SEMIA 587 (2.089 kg/ha), que foi superior em 12,5% ao tratamento sem inoculação e 20,0% ao tratamento com N mineral. Nesse local, todos os tratamentos foram afetados por veranico, na época do enchimento de grãos. Os resultados preliminares da safra 2000/01 indicavam efeito positivo da reinoculação com a estirpe SEMIA 5079, nos dois locais. Nessa safra, a combinação SEMIA 587 + SEMIA 5019, apresentou melhor desempenho que as demais. Nos solos sem população estabelecida de Jaciara e Lucas do Rio Verde, os resultados foram muito prejudicados pelo excesso de chuva na colheita, mas os resultados de nodulação mostram que as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 apresentaram melhor nodulação que as demais, SEMIA 5079 e SEMIA 5080.

TABELA 1.1. Efeito da reinoculação da soja, cv. BRS 133, com estripes 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 2001/02, em solo LRd com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($6,2 \times 10^4$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN PI	MSN mg.pl ⁻¹	N MSPA mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	8,7	7,8	60,6	188	3103
2- 200 kg N/ha ¹	6,7	4,7	60,6	170	2795
3- Semia 587	11,7	13,2	62,8	194	3085
4- Semia 5019	11,3	10,7	61,9	196	3163
5- Semia 5079	13,3	14,8	64,1	197	3077
6- Semia 5080	13,2	15,0	62,4	197	3168
7- Semia 587 + 5019	12,3	14,3	61,6	209	3383
8- Semia 5079 + 5080	7,3	7,0	61,0	184	3025
9- Semia 587 + 5080	11,8	14,3	59,3	192	3228
CV(%)	27,5	35,2	2,0	12,2	11,4
DMS(5%) ²	2,4	3,3	1,0	19,3	292

¹ N aplicado 50% na semeadura e 50% 35 após a emergência, fonte uréia.

² diferença 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".

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

A qualidade de inoculantes experimentais (Tabela 1.5) e comerciais (Tabela 1.6) foram avaliados em estudos de laboratório, casa-de-vegetação e a campo. Em condições de laboratório, foram avaliadas as populações de células em meio agar manitol e seletivo, e a ocorrência de contaminantes em meios BDA e agar nutritivo, em casa-de-vegetação, as populações de células por método de diluição em plantas. Os inoculantes experimentais Masterfix A e Rhizomax B apresentaram número de células em ágar manitol, meio seletivo e em plantas inferiores ao mínimo legal (1×10^8 células/g ou ml inoculante). Os inoculantes comerciais Nitral Urbana e Gelfix apresentaram populações de células inferiores ao mínimo exigido. O inoculante Emerge não apresentou

TABELA 1.2. Efeito da reinoculação da soja, cv. BRS 133, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N na massa seca da parte aérea da planta, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Ponta Grossa, PR, safra 2001/02, em solo LRd com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($4,6 \times 10^4$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN PI	MSN mg.pl ⁻¹	N MSPA mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	13,5	32,5	62,1	115	1856
2- 200 kg N/ha ¹	12,2	20,8	63,6	111	1742
3- Semia 587	13,5	32,5	63,4	133	2089
4- Semia 5019	14,5	27,0	61,5	102	1646
5- Semia 5079	13,0	29,0	62,5	124	1984
6- Semia 5080	13,0	27,8	63,3	106	1670
7- Semia 587 + 5019	14,0	27,8	62,7	123	1956
8- Semia 5079 + 5080	15,5	33,3	62,7	123	1947
9- Semia 587 + 5080	15,2	32,7	62,4	121	1931
CV(%)	19,2	22,1	2,8	14,5	13,6
DMS(5%) ²	2,2	5,3	1,5	13,9	209,3

¹ N aplicado 50% na semeadura e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

² diferença 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";

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

Bradyrhizobium na diluição 10^{-5} . Similarmente ao ano anterior, diversos inoculantes turfosos não apresentaram níveis de contaminantes dentro dos padrões mínimos de qualidade, demonstrando que os processos de esterilização de turfas ainda precisam ser melhorados. A avaliação da eficiência agrônômica a campo foi realizada em solo de Londrina, PR, com população estabelecida de *Bradyrhizobium* e em solo Jaciara, MT (Tabela 1.7) e Lucas do Rio Verde, MT (Tabela 1.8) e, sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Em condições de solo com população estabelecida, os inoculantes não diferiram das testemunhas inoculação-padrão e sem inoculação (Tabela 1.9), mas em solo sem população estabelecida foi possível diferenciar esses inoculantes. No solo sem

TABELA 1.3. Efeito da reinoculação da soja, cv. vitória, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N na massa seca da parte aérea da planta, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Lucas do Rio Verde, MT, safra 2001/02, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($< 1 \times 10^1$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN PI	MSN mg.pl ⁻¹	N MSPA mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	6,7	42	63,5	62,0	976
2- 200 kg N/ha ¹	5,3	40	65,5	50,8	778
3- Semia 587	32,3	109	63,1	68,8	1085
4- Semia 5019	30,5	114	63,6	51,2	802
5- Semia 5079	23,0	59	64,2	44,7	701
6- Semia 5080	20,5	78	64,8	63,5	982
7- Semia 587 + 5019	27,0	73	63,9	50,7	795
8- Semia 5079 + 5080	19,8	89	62,6	43,7	692
9- Semia 587 + 5080	30,2	93	62,8	50,8	809
CV(%)	17,6	23,0	2,7	33,8	34,3
DMS(5%) ²	3,2	14,7	1,4	15,0	239

¹ N aplicado 50% na semeadura e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

² diferença 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";

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

população estabelecida de Jaciara (Tabela 1.7), somente o inoculante Turfal C foi igual ao padrão turfoso e no solo de Lucas do Rio Verde (Tabela 1.8), os inoculantes Rizoliq, Turfal C e Noctin foram iguais ao padrão turfoso.

Para avaliação do terceiro objetivo do projeto, dois tipos de estudos foram realizados. O primeiro consistiu em se comparar o método atual de inoculação, aplicação de inoculante turfoso na dose de 160 000/ semente, com diversas populações de células de *Bradyrhizobium*, variando quantidades de inoculantes e tipos de inoculantes. Esse experimento foi realizado em solos sem população estabelecida de Jaciara e Lucas do Rio Verde. Nas Tabelas 1.10 e 1.11, são apresentados os resultados de número e massa de nódulos secos das combinações de

TABELA 1.4. Efeito da reinoculação da soja, cv. vitória, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N na massa seca da parte aérea da planta, N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Jaciara, MT, safra 2001/02, em solo LRD com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($< 1,0 \times 10^1$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN PI	MSN mg.pl ⁻¹	N MSPA mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	16,7	83	60,0	80	1328
2- 200 kg N/ha ¹	14,5	57	60,6	91	1513
3- Semia 587	26,5	136	63,4	77	1210
4- Semia 5019	25,7	105	62,0	95	1535
5- Semia 5079	25,5	87	63,7	74	1153
6- Semia 5080	19,2	80	62,3	81	1295
7- Semia 587 + 5019	24,0	96	61,5	85	1384
8- Semia 5079 + 5080	25,3	92	62,4	89	1421
9- Semia 587 + 5080	24,0	108	59,5	75	1256
CV(%)	24,8	31,6	3,9	29,3	28,6
DMS(5%) ²	4,6	24,4	2,0	20,0	317

¹ N aplicado 50% na semente e 50% 35 após a emergência, fonte uréia.

² diferença 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";

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

estirpes utilizadas nos inoculantes. Em Jaciara, houve resposta à inoculação até a dose de 700.000 células/semente, com as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 e, para 1.000.000 de células com as estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080 (Tabela 1.10). Em Lucas do Rio Verde, a resposta à inoculação foi até à dose de 700.000 células/semente para as Estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080. Por outro lado, ficou claro que, em ambos os locais, 300.000 células/semente não são suficientes para obter nodulação máxima e, por isso, a recomendação técnica de 300.000 células/semente necessita ser alterada. O outro estudo, com quatro experimentos instalados em Londrina, PR, Avaré, SP, Jaciara, MT e Lucas do

TABELA 1.5. Número de células de *Bradyrhizobium* por g ou ml de inoculante obtidos em meios de cultura agar manitol, meio seletivo e em plantas e número de contaminantes obtidos em BDA e ágar nutritivo. Embrapa Soja, 2002.

Inoculantes ¹	Ágar manitol	Meio seletivo	BDA	Ágar nutritivo	NMP em plantas
Biomax (L)	3,0x10 ⁹	2,8x10 ⁹	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	7,8x10 ⁸
Bioarts (L)	7,2x10 ⁸	7,3x10 ⁸	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	4,6x10 ⁸
Rizoliq (L)	5,7x10 ⁹	2,5x10 ⁹	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	2,8x10 ⁹
Rizolik-plus (L)	5,6x10 ⁹	2,7x10 ⁹	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	1,7x10 ⁹
Masterfix A (L)	1,7x10 ⁷	3,0x10 ⁷	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	1,3x10 ⁷
Masterfix B (L)	6,0x10 ⁸	6,5x10 ⁸	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	1,7x10 ⁹
Rhizomax A (L)	1,5x10 ⁹	1,0x10 ⁹	0,0x10 ⁵	1,3x10 ¹⁰	1,9x10 ⁹
Rhizomax B (L)	2,0x10 ⁷	1,2x10 ⁷	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	1,2x10 ⁷
Noctin (L)	7,6x10 ⁹	6,7x10 ⁹	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	3,5x10 ⁹
Glycine max (T)	4,6x10 ⁹	3,5x10 ⁹	0,0x10 ⁵	3,5x10 ⁸	2,4x10 ⁹

¹ Inoculantes avaliados, sendo que alguns são comerciais e outros que estão em testes de eficiência agrônômica para registro junto ao MAPA. (L) líquido e (T) turfosos.

TABELA 1.6. Número de células de *Bradyrhizobium*/ g ou ml de inoculante obtidos em diferentes meios de cultura e número de contaminantes em inoculantes comerciais. Embrapa Soja, 2002.

Inoculantes	Ágar manitol	Meio seletivo	Contaminantes
587 + 5019 (T)	1,4x10 ⁸	7,3x10 ⁷	3,1x10 ⁸
5079 + 5080 (T)	1,4 x10 ⁸	5,0x10 ⁷	1,7x10 ⁸
Biagro (T)	3,1x10 ⁹	6,0x10 ⁹	0,0x10 ⁵
Biomax (T)	2,0x10 ⁹	2,5x10 ⁹	0,0x10 ⁵
Nitral Urbana (T)	6,0x10 ⁸	5,7x10 ⁸	1,0x10 ⁹
Nitral Urbana (T)	1,0x10 ⁷	5,0x10 ⁷	1,6x10 ⁸
Emerge (PM)	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵	0,0x10 ⁵
Gelfix (L)	2,8x10 ⁷	3,4x10 ⁸	3,2x10 ⁸
Gelfix (L)	2,4x10 ⁸	5,2x10 ⁷	1,6x10 ⁸
Cell Tech (L)	4,0x10 ⁹	3,2x10 ⁹	0,0x10 ⁵

TABELA 1.7. Efeito da inoculação da soja, cv. Vitória, com diferentes inoculantes no número de nódulos obtidos em solos de primeiro ano de cultivo em Jaciara, MT, safra 2001/02. Resultados médios de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN./pl	MSN mg/pl.	N g/kg	N grãos kg/ha	Grãos k/ha
Sem inoculação	5,8	47,2	59,3	62,8	1062
IP + 200 kg N/ha	1,8	10,3	59,4	57,2	962
IP 300 000 (587 + 5019) ²	19,7	109,3	58,9	65,2	1107
IP 300 000 (5079 + 5080) ³	13,2	74,3	59,6	68,0	1138
Inoculação padrão (IP) ¹	23,7	88,7	60,1	77,7	1298
I com Masterfix A (L)	6,3	45,5	58,7	57,7	985
I com Masterfix B (L)	7,2	59,5	59,3	54,8	929
I com Rizoliq (L)	7,8	59,5	59,6	57,3	968
I com Rizopack (L)	7,8	61,5	57,1	61,5	1069
I com Turfal A (L)	7,2	52,8	56,5	73,0	1293
I com Turfal B (L)	6,8	67,2	58,1	63,2	1093
I com Turfal C (T)	20,2	95,0	59,7	74,5	1268
I com Noctin (L)	9,8	64,2	62,7	63,8	1015
I com Biomax (L)	8,5	51,3	62,6	62,0	990
I com Bioarts (L)	6,0	49,3	62,0	75,5	1215
CV (%)	25,0	28,7	2,5	35,8	36,1
DMS (5%)	2,0	14,3	1,2	18,6	316

¹ Aplicação de 200 kg na forma de uréia, sendo 50% na semente e 50 aos 35 após emergência;

² 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000/semente da SEMIA 587 (população de $3,0 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente da SEMIA 5019 (população de $2,1 \times 10^8$);

³ 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000 células/semente da SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente SEMIA 5080, (população de $3,8 \times 10^8$);

⁴ 300 ml de água açucarada (10%) mais 500g/50 kg de semente de inoculante turfoso, composto das estirpes SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) e SEMIA 5080 (população de $3,8 \times 10^8$);

⁵ diferença 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".

Rio Verde, MT, teve o objetivo de comparar o método de inoculação atual, aplicação de inoculante turfoso nas sementes com e sem fungicidas e micronutrientes com a aplicação de doses de inoculante líquido no sulco de semente. Em Avaré e Londrina, as aplicações do

TABELA 1.8. Efeito da inoculação da soja, cv. Vitória, com diferentes inoculantes no número de nódulos obtidos em solos de primeiro ano de cultivo de Lucas do Rio Verde, MT, safra 2001/02. Resultados médios de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN./pl	MSN mg/pl.	N g/kg	N grãos kg/ha	Grãos k/ha
Sem inoculação	8,2	47,8	60,5	51,5	849
IP + 200 kg N/ha	6,0	20,8	61,7	41,2	672
IP 300 000 (587 + 5019) ²	24,5	80,0	60,6	50,0	826
IP 300 000 (5079 + 5080) ³	17,8	36,8	60,0	49,8	830
Inoculação padrão (IP) ¹	23,0	48,3	60,6	55,3	910
I com Masterfix A (L)	13,8	44,3	60,1	34,2	570
I com Masterfix B (L)	15,0	68,5	60,6	56,2	931
I com Rizoliq (L)	23,5	57,0	61,8	41,5	673
I com Rizopack (L)	18,8	46,5	60,8	58,3	959
I com Turfal A (L)	10,7	41,2	59,5	42,2	711
I com Turfal B (L)	10,8	38,0	59,6	31,3	525
I com Turfal C (T)	22,7	68,3	60,8	69,3	1133
I com Noctin (L)	26,0	75,0	60,9	52,2	855
I com Biomax (L)	14,0	48,0	59,3	47,5	784
I com Bioarts (L)	19,2	72,7	59,8	44,7	748
CV (%)	15,7	23,0	2,5	33,2	33,2
DMS (5%)	2,1	9,7	1,2	12,8	212

¹ aplicação de 200 kg na forma de uréia, sendo 50% no plantio e 50 aos 35 após emergência;

² 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000/semente da SEMIA 587 (população de $3,0 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente da SEMIA 5019 (população de $2,1 \times 10^8$);

³ 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000 células/semente da SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente SEMIA 5080, (população de $3,8 \times 10^8$);

⁴ 300 ml de água açucarada (10%) mais 500g/50 kg de semente de inoculante turfoso, composto das estirpes SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) e SEMIA 5080 (população de $3,8 \times 10^8$);

⁵ diferença 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".

inoculante líquido e a semeadura foram feitas com máquinas adaptadas e, em Jaciara e Lucas do Rio Verde, a aplicação do inoculante líquido foi feita por pulverizador costal e a semeadura manualmente. Em solo de Londrina, com população estabelecida de *Bradyrhizobium*

TABELA 1.9. Efeito da inoculação da soja, cv. BRS 133, com diferentes inoculantes no número de nódulos obtidos em solo de Londrina, PR, com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, safra 2001/02. Resultados médios de seis repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN./pl	MSN mg/pl.	N g/kg	N grãos kg/ha	Grãos k/ha
Sem inoculação	12,5	11,5	56,6	202	3572
IP + 200 kg N/ha ¹	8,3	6,3	57,1	212	3706
IP 300 000 (587 + 5019) ²	10,5	10,0	57,8	208	3595
IP 300 000 (5079 + 5080) ³	11,0	11,3	57,8	204	3524
Inoculação padrão (IP) ⁴	11,3	12,0	54,5	193	3542
I com Masterfix A (L)	9,8	10,0	55,6	192	3453
I com Masterfix B (L)	10,5	10,8	55,5	203	3659
I com Rizoliq (L)	13,0	11,8	55,5	192	3446
I com Rizopack (L)	10,2	9,3	55,5	201	3623
I com Turfal A (L)	10,5	10,0	55,6	206	3705
I com Turfal B (L)	11,2	11,3	55,4	202	3644
I com Turfal C (T)	12,8	13,7	56,7	197	3471
I com Noctin (L)	14,2	15,0	55,7	201	3610
I com Biomax (L)	10,8	11,5	63,0	215	3408
I com Bioarts (L)	11,8	11,0	61,5	218	3549
CV (%)	16,4	28,8	2,4	5,9	5,3
DMS (5%) ⁵	1,5	2,5	1,1	9,5	151

¹ Aplicação de 200 kg na forma de uréia, sendo 50% na semente e 50 aos 35 após emergência;

² 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000/semente da SEMIA 587 (população de $3,0 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente da SEMIA 5019 (população de $2,1 \times 10^8$);

³ 300 ml de água açucarada (10%) mais de inoculante turfoso: 80.000 células/semente da SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) mais 80.000 células/semente SEMIA 5080, (população de $3,8 \times 10^8$);

⁴ 300 ml de água açucarada (10%) mais 500g/50 kg de semente de inoculante turfoso, composto das estirpes SEMIA 5079 (população de $4,3 \times 10^8$) e SEMIA 5080 (população de $3,8 \times 10^8$);

⁵ diferença 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".

de ($6,2 \times 10^4$ células/g solo), a melhor dose de inoculante aplicada por aspersão no sulco de semente foi a de 1.200 ml, com o uso de sementes tratadas com fungicidas e micronutrientes, apresentando resultados similares à testemunha "inoculação padrão" com 500 g de

TABELA 1.10. Efeito do número de células de *Bradyrhizobium* das estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080, no número de nódulos por planta (NN/pl.) e massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), cv. conquista, em solo de primeiro ano de cultivo de soja de Jaciara, MT, safra 2001/02. Resultados médios de 6 repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	SEMIA 587 + SEMIA 5019		SEMIA 5079 + SEMIA 5080	
	NN ² /pl	MSN/mg.pl ⁻¹	NN ² /pl	MSN/mg.pl ⁻¹
Sem inoculação	6	47	6	47
200 kg N ¹	2	10	2	10
IP com 160 000 células	17	77	11	75
IP com 300 000 células	20	109	13	74
IP com 700 000 células	25 ^a	134 ^a	15	80
IP com 1000 000 células	26 ^a	120 ^{ab}	28 ^a	115 ^a
IP padrão ³	-	-	24	89
CV	19,2	22,3	21,8	22,8

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após emergência;

² Médias seguidas de mesma letra, na coluna, indica que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan;

³ Aplicação de 1.700.000 células por semente.

TABELA 1.11. Efeito do número de células de *Bradyrhizobium* das estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080, no número de nódulos por planta (NN/pl.) e massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), cv. conquista, em solo de primeiro ano de cultivo de soja de Lucas do Rio Verde, MT, safra 2001/02. Resultados médios de 6 repetições. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	SEMIA 587 + SEMIA 5019		SEMIA 5079 + SEMIA 5080	
	NN ² /pl	MSN/mg.pl ⁻¹	NN ² /pl	MSN/mg.pl ⁻¹
Sem inoculação	8 c	48 b	8 d	48 ab
200 kg N ¹	6 c	21 c	6 d	21 c
IP com 160 000 células	17 b	52 b	15 c	45 b
IP com 300 000 células	25 a	80 a	18 b	37 bc
IP com 700 000 células	26 a	67 ab	21 a	56 ab
IP com 1000 000 células	27 a	56 b	23 a	66 a
IP padrão ³	-	-	23 a	48 ab
CV	18,1	28,9	16,1	31,4

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após emergência;

² médias seguidas de mesma letra, na coluna, indica que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan;

³ aplicação de 1.700.000 células por semente.

inoculante (Tabela 1.12). Em solo de Avaré, SP, sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* (população inferior a $0,0 \times 10^2$ células/g solo), a maior dose inoculante aplicada por aspersão (1.200 ml) apresentou nodulação de grãos inferior ao padrão turfoso de 500 g de inoculante por 50/kg de semente (Tabela 1.13). No solo de Jaciara, MT, sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* (população inferior a $0,6 \times 10^2$ células/g solo), a nodulação com o inoculante turfoso padrão foi equivalente à nodulação com a aplicação de 1.200 ml de inoculante líquido no sulco de semeadura, com as sementes tratadas com fungicidas e micronutrientes (Tabela 1.14). No solo de Lucas do Rio Verde, MT, sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* (população inferior a $1,0 \times 10^1$ células/g solo), a nodulação com o inoculante turfoso padrão foi equivalente à nodulação com a aplicação de 1.200 ml de inoculante líquido no sulco de semeadura, com as sementes tratadas com fungicidas e micronutrientes (Tabela 1.15). Os demais parâmetros avaliados, N total nos grãos e rendimento de grãos, não diferiram entre si. Esses resultados indicam ser possível substituir a aplicação tradicional de inoculantes nas sementes pela aplicação do inoculante no sulco de semeadura com sementes que receberam fungicidas e micronutrientes. Entretanto, isso implica em aumentar a dose de inoculante de quatro a seis vezes. Estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade econômica dessa prática.



1.2 Compatibilidade de aplicação de inoculantes com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.2001.340-02)

Rubens J. Campo; Mariangela Hungria; Everson Laureto; Leni Mieko Miura;
Rubson Natal R. Sibaldelli; José Zuca Moraes; Miguel Pereira de Souza

O cultivo sucessivo da soja e a sua expansão para diversas regiões do Brasil implicam em maior uso de fungicidas, inseticidas e micronutrientes nas sementes da soja junto com a inoculação. Por outro lado, sucessi-

TABELA 1.12. Efeito da aplicação do inoculante líquido por aspersão mecânica no sulco de semeadura com o uso de sementes de soja tratadas com fungicidas e micronutrientes no número de nódulos por planta (NN/pl.), massa de nódulos secos (MSN em mg.pl⁻¹), N na massa seca da planta (N MSPA mg.pl⁻¹) teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹) N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Londrina, PR, safra 2001/02. Média de seis repetições. Londrina. Embrapa Soja 2002.

Tratamentos	NN/pl	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. kg.ha ⁻¹
1. Sem inoculação	6 c	7 c	60,4a	193 c	3189 b
2. 200 kg N	8 bc	8 bc	60,2a	200 bc	3311 b
3. IP	14a	18a	61,0a	217abc	3564ab
4. TSI + IP	8 bc	17a	60,0a	229ab	3827a
5. 300ml II + TSI	9 b	10abc	60,0a	242a	4072a
6. 600ml II + TSI	10 b	12abc	60,0a	236a	3962a
7. 1200ml II + TSI	12a	16ab	60,0a	238a	3969a
CV	17,8	45,9	1,7	9,8	9,8

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após a emergência;

² inoculação com inoculante turfoso na dose de 500 g/50 kg semente de um inoculante constituído das estirpes: SEMIA 5079 (7,8 x 10⁶ células/g inoculante) e SEMIA 5080 (2,0 x 10⁹ células/g inoculante);

³ (TSI + IP) sementes de soja foram tratadas com os fungicidas Euparen M 500 PM, na dose de 50 g/kg + Topsin 500, na dose de 40 ml/ 50 kg e com o micronutriente Bayfolan Pró TS, na dose de 100 ml por 100kg semente (TSI/Bayer) e posteriormente inoculadas conforme tratamento;

⁴ inoculante líquido (II) com população de 7,2 x 10⁶ células/ml, constituído das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 + SEMIA 5080;

⁵ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan;

⁶ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 1.13. Efeito da aplicação do inoculante líquido por aspersão mecânica no sulco de semeadura com o uso de sementes de soja tratadas com fungicidas e micronutrientes no número de nódulos por planta (NN/pl.), N na massa seca da planta (N MSPA mg.pl⁻¹) teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹) N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Avaré, SP, safra 2001/02. Média de seis repetições. Londrina, Embrapa Soja 2002.

Tratamentos	NN/pl	MSN Mg.pl ⁻¹	N grãos mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. kg.ha ⁻¹
1. Sem inoculação	0,3 e	10 d	62,0ab	92a	1492a
2. 200 kg N	0,3 e	2 d	60,3 b	90a	1488a
3. IP	21a	68a	60,0 b	99a	1642a
4. TSI + IP	4 d	32 c	60,0 b	106a	1759a
5. 300ml l. liq. + TSI	5 d	36 c	62,0ab	99a	1614a
6. 600ml l. liq. + TSI	10 c	52 b	61,2ab	114a	1861a
7. 1200ml l. liq. + TSI	14 b	64ab	62,2a	116a	1866a
CV	18,7	28,2	1,9	21,3	20,9

¹ N aplicado como ureia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após a emergência.

² inoculação com inoculante turfoso na dose de 500 g/50 kg semente de um inoculante constituído das estirpes: SEMIA 5079 (7,8 x 10⁸ células/g inoculante) e SEMIA 5080 (2,0 x 10⁸ células/g inoculante).

³ (TSI + IP) sementes de soja foram tratadas com os fungicidas Euparen M 500 PM, na dose de 50 g/kg + Topsin 500, na dose de 40 ml/ 50 kg e com o micronutriente Bayfolan Prô TS, na dose de 100 ml por 100kg semente (TSI Bayer) e posteriormente inoculadas conforme tratamento;

⁴ inoculante líquido com população de 7,2 x 10⁸ células/ml, constituído das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 + SEMIA 5080;

⁵ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

⁶ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 1.14. Efeito da aplicação do inoculante líquido por aspersão manual no sulco de semeadura com o uso de sementes de soja tratadas com fungicidas e micronutrientes no número de nódulos por planta (NN/pl.), massa de nódulos secos (MSN em mg.pl⁻¹), N na massa seca da planta (N MSPA mg.pl⁻¹) teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹) N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Jaciara, safra 2001/02. Média de seis repetições. Londrina, Embrapa Soja 2002.

Tratamentos	NN/pl	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. kg.ha ⁻¹
1. Sem inoculação	5 d	40 c	62,0a	64a	1027a
2. 200 kg N	2 e	10 d	61,0abc	58a	954a
3. IP	18a	68a	61,3ab	71a	1157a
4. TSI + IP	10 b	67a	60,3abc	72a	1193a
5. 300ml l. lig. + TSI	7 c	46 bc	62,0a	67a	1080a
6. 600ml l. lig. + TSI	8 c	56ab	60,1 bc	60a	1003a
7. 1200ml l. liq. + TSI	9 bc	61a	60,0 c	66a	1095a
CV	16,7	20,4	1,7	25,3	25,2

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após a emergência;

² inoculação com inoculante turfoso na dose de 500 g/50 kg semente de um inoculante constituído das estirpes: SEMIA 5079 (7,8 x 10⁸ células/g inoculante) e SEMIA 5080 (2,0 x 10⁸ células/g inoculante);

³ (TSI + IP) sementes de soja foram tratadas com os fungicidas Euparen M 500 PM, na dose de 50 g/kg + Topsin 500, na dose de 40 ml/ 50 kg e com o micronutriente Bayfolan Pró TS, na dose de 100 ml por 100kg semente (TSI Bayer) e posteriormente inoculadas conforme tratamento;

⁴ inoculante líquido com população de 7,2 x 10⁸ células/ml, constituído das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 + SEMIA 5080;

⁵ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan;

⁶ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 1.15. Efeito da aplicação do inoculante líquido por aspersão manual no sulco de semeadura com o uso de sementes de soja tratadas com fungicidas e micronutrientes no número de nódulos por planta (NN/pl.), massa de nódulos secos (MSN em mg.pl⁻¹), N na massa seca da planta (N MSPA mg.pl⁻¹) teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹) N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Lucas do Rio Verde, safra 2001/02. Média de seis repetições. Embrapa Soja 2002.

Tratamentos	NN/plpl	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. kg.ha ⁻¹
1. Sem inoculação	8	d	61,9a	59a	952a
2. 200 kg N ¹	6	d	60,9a	72a	1184a
3. IP ²	31a	71ab	60,7a	65a	1079a
4. TSI + IP	30a	75a	60,6a	71a	1175a
5. 300ml l. lig. + TSI	20	c	61,0a	61a	1009a
6. 600ml l. liq. + TSI	25	b	62,1a	60a	966a
7. 1200ml l. lig. + TSI	29ab	69ab	61,3a	70a	1138a
CV	16,1	31,8	1,9	28,5	29,4

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% na semeadura e 50% aos 30 dias após a emergência;

² inoculação com inoculante turfoso na dose de 500 g/50 kg semente de um inoculante constituído das estirpes: SEMIA 5079 (7,8 x 10⁸ células/g inoculante) e SEMIA 5080 (2,0 x 10⁸ células/g inoculante);

³ (TSI + IP) sementes de soja foram tratadas com os fungicidas Euparen M 500 PM, na dose de 50 g/kg + Topsin 500, na dose de 40 ml/ 50 kg e com o micronutriente Bayfolan Pró TS, na dose de 100 ml por 100kg semente (TSI Bayer) e posteriormente inoculadas conforme tratamento;

⁴ inoculante líquido com população de 7,2 x 10⁸ células/ml, constituído das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 + SEMIA 5080;

⁵ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan;

⁶ rendimento corrigido para 13% de umidade.

vos incrementos na sua produtividade, implicam também no aumento da demanda de nitrogênio (N) pela planta, que é o nutriente que ela mais necessita. A principal e mais barata fonte de N para a soja é a fixação biológica do N atmosférico (N_2) por simbiose e, conseqüentemente, torna-se importante melhorar a sua eficiência. A eficiência da fixação biológica do N_2 (FBN) atmosférico do solo depende de uma série de fatores inerentes à bactéria e à planta. Dentre esses, é sabido que, ao aumentar a população de células viáveis da bactéria na semente, através da inoculação, aumenta-se a ocorrência de nódulos na coroa do sistema radicular da soja, onde os nódulos possuem maior eficiência de FBN.

O método atual de inoculação das sementes de soja consiste na aplicação do inoculante às sementes, logo após os fungicidas, os micronutrientes Co e Mo e os inseticidas. Isso tem causado redução do número de células nas sementes, que podem estar causando redução na nodulação e na FBN. Essa redução depende do tipo do inoculante, do fungicida, do inseticida e dos produtos que contêm os micronutrientes Co e Mo. Atualmente, existe no mercado uma diversidade muito grande de produtos fungicidas, inseticidas, micronutrientes e inoculantes. Entretanto, pouco se conhece dos seus efeitos tóxicos sobre a bactéria. Assim, este trabalho tem o objetivo de conhecer a intensidade dos efeitos tóxicos dos diferentes fungicidas, inseticidas e micronutrientes sobre a bactéria, quando aplicados isoladamente e em conjunto nas sementes e o de buscar alternativas de aplicação desses produtos, de forma que não reduzam a população da bactéria nas sementes e, por conseqüência, a eficiência de FBN. No caso específico de micronutrientes, serão efetuados estudos com métodos alternativos de aplicação do Mo e Co via foliar e do Mo por sementes enriquecidas em Mo, bem como da validação do uso de sementes ricas em Mo, em diversas lavouras de soja.

Os diferentes princípios ativos recomendados para a soja, de fungicidas, inseticidas e as diferentes fontes de micronutrientes foram testados isoladamente e em conjunto, para compatibilizar o seu uso com os diferentes tipos de inoculantes. A aplicação dos produtos fungicidas,

inseticidas e micronutrientes nas sementes foi imediatamente antes da inoculação. As sementes tratadas e inoculadas foram semeadas em solos com e sem população estabelecida, para determinação da sobrevivência da bactéria a campo para avaliação da nodulação e da eficiência da FBN.

1.2.1 Micronutrientes

Em solos sem população estabelecida de Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT, avaliou-se o efeito da aplicação dos produtos nas sementes sobre a nodulação e, em Londrina, PR, em solo com população estabelecida, avaliou-se a eficiência da aplicação dos produtos nas sementes e por pulverização via foliar (V4) sobre o rendimento de grãos. Os micronutrientes utilizados foram: CoMofix, Ubifol, Grap 180 JE, Nodulus, CoMo, Comosol 2000, Néctar, Biocrop, CoBaMol, Rizomicro, Glycimol e Comosol BR4, CoMol HC e CoMol HC cerrado, todos aplicados na dose recomendada. As testemunhas utilizadas foram: NaMoO_4 na dose de 20g de Mo/ha mais CoCl_2 na dose 2,5 g/ha, aplicados vias semente e foliar e os "tratamentos controles" sem inoculação, inoculação padrão (IP) e com 200 kg/ha de N. Os produtos CoMofix, Comosol 2000, Biocrop, Rizomicro Comosol BR4, em Jaciara, e CoMofix, Biocrop, Comosol BR4 e CoMol HC, em Lucas do Rio Verde, foram os produtos que menos reduziram nodulação, número e massa de nódulos secos (Tabela 1.16). Em Londrina (Tabela 1.17), em área com população estabelecida, os produtos que apresentaram os melhores rendimentos quando aplicados nas sementes foram (a) Comosol BR4, Biocrop e Glycimol, (b) foliar Comosol BR4, Grap 180, Biocrop e CoMol BC e na média dos dois métodos de aplicação, (c) Comosol BR4, Biocrop, Glycimol, e Grap 180. Além dos efeitos do Mo na nodulação, os efeitos de duas fontes de cobalto foram avaliados. Em solo sem população estabelecida da bactéria, Jaciara (Tabela 1.18), as duas fontes de Co, sulfato e cloreto, reduziram a nodulação quando aplicados nas sementes e não reduziram quando aplicados via foliar. Em solo de população estabelecida de Londrina (Tabela 1.18), somente o Cloreto de Co, aplicação foliar, apresentou efeito positivo sobre o rendimento de grãos.

TABELA 1.16. Efeito da aplicação de micronutrientes nas sementes de soja, cv Conquista, juntamente com inoculante no N^o e massa de nódulos secos. Experimento conduzido em Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT, em solos sem populações estabelecidas de *Bradyrhizobium*. Embrapa Soja, 2002.

Tratamento	Jaciara		Lucas do Rio Verde	
	N ^o	MSN/mg	N ^o	MSN/mg
01 = Sem Inoculação	11	56	9	37
03 = IP + 200Kg N ²	16	53	15	34
03 = IP ¹	27	118	29	66
04 = SI + Co + Mo ³ (semente)	13	66	10	41
05 = IP + Co + Mo (semente)	22	95	27	58
06 = IP + Co + Mo (foliar)	24	94	28	62
07 = IP + CoMofix (Nitral Urbana)	25	114	29	59
08 = IP + Ubifol	24	96	27	55
09 = IP + Agrocrete (Grap 180 JE)	22	94	27	61
10 = IP + Nodulus (Bio Soja)	12	59	26	64
11 = IP + CoMo (Stoller)	19	85	24	61
12 = IP + Comosol 2000 (Nutriplant)	27	111	27	59
13 = IP + Nectar (Miroquimica)	11	64	19	48
14 = IP + Biocrop (Microquimica)	22	110	28	78
15 = IP + CoBaMol (RCN-agro)	18	93	24	54
16 = IP + Rizomicro	21	116	22	40
17 = IP + Glycimol	20	93	26	59
18 = IP + Comosol BR4	24	106	28	63
19 = IP + CoMol HC (BASF)	23	99	28	65
20 = IP + CoMol HC cerrado (BASF)	20	101	25	63

CV (%)

DMS (5%)⁴

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, com população de células de $1,7 \times 10^{10}$ por grama de inoculante;

² N aplicado na fonte Uréia, sendo 50% no plantio e 50% em cobertura aos 30 DAE;

³ as fontes dos micronutrientes usadas foram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nas doses de 2,5 g de Co e 20 g de Mo por ha (75 kg de semente);

⁴ DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos, cada um com seis repetições, 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";

⁵ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 1.17. Efeito da aplicação de micronutrientes de diversos produtos comerciais aplicados via foliar e semente, sobre o rendimento de grãos de soja (kg/ha), cv. BRS 133. Experimento conduzido em Londrina, em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Embrapa Soja, 2002.

Tratamento	Semente Cl ⁴	Foliar Cl	Média
01 = Sem Inoculação	-	-	2924
02 = IP ¹	-	-	3158
03 = IP + 200kg N ²	-	-	3499
04 = IP + Co + Mo ³	3181	3302	3242
05 = IP + CoMofix (Nitral Urbana)	3256	3426	3341
06 = IP + Ubifol	3436	3321	3379
07 = IP + Agrocefe (Grap 180 JE)	3336	3588 2	3462
08 = IP + Nodulus (Bio Soja)	3045	3394	3220
09 = IP + CoMo (Stoller)	3445	3420	3433
10 = IP + Comosol 2000 (Nutriplant)	3254	3233	3244
11 = IP + Nectar (Miroquimica)	3439	3290	3365
12 = IP + Biocrop (Microquimica)	3515 2	3526 3	3521
13 = IP + CoBaMol (RCN-agro)	3262	3316	3289
14 = IP + Rizomicro	3450	3437	3444
15 = IP + Glycimol	3508 3	3425	3467
16 = IP + Comosol BR4	3542 1	3603 1	3573
17 = IP + CoMol HC (BASF)	3378	3512 4	3445
18 = IP + CoMol HC cerrado (BASF)	3259	3251	3255

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, com população de células de $1,7 \times 10^{10}$ por grama de inoculante;

² N aplicado na fonte Uréia, sendo 50% no plantio e 50% em cobertura aos 30 DAE;

³ as fontes dos micronutrientes usadas foram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nas doses de 2,5 g de Co e 20 g de Mo por ha (75 kg de semente). As demais fontes de Mo foram calculadas para 20 g de Mo/ha;

⁴ Cl. - classificação.

1.2.2 Fungicidas

Trabalhos anteriores mostraram que a aplicação conjunta de inoculante com fungicidas nas sementes reduz a nodulação e a FBN. Esses resultados mostraram que, dos fungicidas recomendados para a cultura da soja as combinações Carboxin + Thiram, Difenconazole + Thiram,

TABELA 1.18. Efeito da aplicação de 2,5 g de Co na semente sobre a nodulação e o rendimento de grãos de soja em dois tipos de solo, Londrina com população estabelecida e Jaciara sem população estabelecida. Londrina, PR. Embrapa Soja, 2002.

Tratamento	Londrina		Jaciara	
	N.º nódulos	Rend. kg/ha ³	Nº nódulos	Rend. kg/ha ³
Inoculação Padrão (IP) ¹	17,2	3349	26,7	1294
IP + Co (Cloreto de Co)	17,0	3295	15,0	1250
SI + Co (sulfato de Co)	15,3	3155	22,0	1197
IP + Co (foliar aos 30 D fonte 1)	18,3	3405	25,3	1299
IP + Co (foliar aos 30 D fonte 2)	16,5	2951	25,7	1056
CV (%)	20,1	10,7	18,5	23,2
DMS (5%) ²	2,9	294	3,6	241

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 5079+ SEMIA 5080, com população de $1,4 \times 10^9$ células/g de inoculante.

² DMS - Diferença entre médias de dois tratamentos, cada um com seis repetições, 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 rendimento corrigido para 13% de umidade.

Thiabendazole + Tolyfluanid, Carbendazin + Thiram e Carbendazin + Captan foram as menos tóxicas. Na prática, os produtores de soja utilizam os fungicidas isoladamente ou em aplicações anteriores à semeadura, embora a recomendação de fungicidas seja contato + sistêmico, por ocasião da semeadura. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos, em conjunto e isoladamente e, quando em conjunto, aplicados 15 dias antes da semeadura, na nodulação, no potencial de FBN e na emergência das plântulas a campo. Nesta safra, os experimentos foram realizados em dois ambientes, Jaciara e Lucas do Rio Verde (Tabela 1.19). Os fungicidas foram aplicados nas sementes, conforme as doses recomendadas. Em Jaciara, o único tratamento que não reduziu o número de nódulos foi o Carboxin e vários deles não afetaram a massa seca de nódulos. Entretanto, somente os tratamen-

TABELA 1.19. Efeito da aplicação de fungicidas nas sementes de soja, cv. Vitória, juntamente com o inoculante no N.º e massa de nódulos secos, N total nos grãos, rendimento de grãos e emergência de plântulas à campo, com população de *Bradyrhizobium* x 10² células/g solo. Embrapa Soja, 2001.

Tratamentos fungicidas	Jaciara		Lucas do Rio Verde	
	Nº	MSN/mg E (%)	Nº	MSN/mg E (%)
Testemunha sem Inoculação	10,5	64	9,0	43
IP + 200Kg N (50 % + 50% 30 DAE)	15,8	51	21,5	45
Inoculação padrão (IP) ¹	24,0	92	33,8	79
IP + Carbendazin (Derosal 500 SC)	18,7	73	30,2	64
IP + Carboxin (Vitavax 750 PM)	21,3	80	25,5	62
IP + Thiabendazole (Tecto 100 PM)	18,7	79	27,0	68
IP + Difenconazole (Spectro)	18,0	72	29,2	69
IP + Captan 750 TS	13,5	75	16,8	68
IP + Thiram (Rhodiauran 500 SC)	20,7	90	20,2	70
IP + Tolyfluanid (Euparen M 500 PM)	17,0	92	20,7	71
IP + Carboxin + Thiram	12,7	65	17,0	58
IP + Thiabendazole + Tolyfluanid	18,8	82	14,0	37
IP + Carbendazin + Thiram	18,3	80	14,5	37
IP + Carbendazin + Captan	12,3	61	18,3	63
IP + Difenconazole + Thiram	17,7	81	18,2	70
IP + Carboxin + Thiram	16,3	81	21,0	61
IP + Thiabendazole + Tolyfluanid	21,0	89	15,0	63

Continua...

Tratamentos fungicidas

...Continuação Tabela 1.19

	Jaciara		Lucas do Rio Verde	
	Nº	MSN/mg E (%)	Nº	MSN/mg E (%)
IP + Carbendazim + Thiram	20,7	82	20,8	66
IP + Carbendazim + Captan	16,0	82	16,3	52
IP + Difenoconazole + Thiram	20,7	81	22,7	73
CV (%)	20,8	24,7	16,6	22,6
DMS (5%) ²	2,9	15,3	2,7	11,0

¹ 300 ml de água apucarada a 10% mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080, com população de $4,1 \times 10^9$ células/g de inoculante.

² DMS - diferença entre médias de dois tratamentos, cada um com seis repetições, 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 rendimento corrigido para 13% de umidade.

tos Carbendazin + Thiram e Carboxin + Thiram, aplicados 15 dias antes da semeadura, apresentaram emergência à campo superior à testemunha sem inoculação. Em Lucas do Rio Verde, todos os tratamentos reduziram o número de nódulos e os tratamentos Difenoconazole, Thiram, Tolyfluanid, Difenoconazole + Thiram e o tratamento Difenoconazole + Thiram, aplicado 15 dias antes da semeadura, foram os únicos que não reduziram a massa de nódulos. Por outro lado, somente os tratamentos Carboxin + Thiram e Carbendazin + Thiram, aplicado 15 dias antes da semeadura, foram eficientes e apresentaram emergência à campo superior à testemunha inoculação-padrão.

1.2.3 Inseticidas

A monocultura da soja ou a simples sucessão soja-trigo, em sistema de semeadura direta, reduz o controle de insetos de solo de forma natural e aumenta a ocorrência do inseto *Sternechus subsignatus*. A larva desse inseto, para se alimentar, raspa e desfia o caule da soja. Se ela ocorrer no início do estágio vegetativo, a planta é totalmente destruída. Assim, além do controle químico e do manejo integrado com rotação de culturas para controle do inseto, o tratamento de sementes com inseticida passou a ser usado pelos agricultores com bastante sucesso. Entretanto, pouco se conhece dos efeitos que esses produtos possam estar causando à fixação biológica do nitrogênio (FBN). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação conjunta de inseticidas e inoculante na FBN com a cultura da soja. Os experimentos foram instalados em blocos ao acaso em seis repetições, em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* de Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT. Foram avaliados os inseticidas Standak, Cruiser e Gaúcho, todos na dose recomendada. Em Jaciara (Tabela 1.20) o inseticida Cruiser afetou o número e os inseticidas Cruiser e Gaúcho afetaram a massa de nódulos secos. Em Lucas do Rio Verde, os inseticidas Cruiser e Gaúcho reduziram a massa de nódulos mas, juntamente com o Standak, não houve essa redução. Os demais parâmetros não foram avaliados em função dos problemas de excesso de chuva na colheita.

TABELA 1.20. Efeito da aplicação de inseticidas nas sementes de soja, cv. Conquista, juntamente com inoculante no nº e massa de nódulos secos, N total nos grãos e rendimento de grãos de soja. Experimento conduzido em Jaciara, MT, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Embrapa Soja, 2002.

Tratamentos	NN ³ /pl	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos Mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ⁴ kg.ha ⁻¹
Sem inoculação	9 d	66 c	59 b	80a	1346a
Inoculação padrão (IP) ¹	19 b	97ab	61a	84a	1359a
IP + 200 kg de N ²	14 c	68 c	60 b	98a	1633a
Standak (200ml/50kg) + IP	25 a	112a	60 b	80a	1330a
Cruiser (150ml/50kg) + IP	21 b	90 b	60 b	92a	1523a
Gaucho (175 ml/50 kg) + IP	24 a	90 b	60 b	84a	1388a
CV	11,7	18,8	1,1	32,0	31,6

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, com população de células de $1,7 \times 10^9$ por grama de inoculante.

² N aplicado na fonte Uréia, sendo 50% no plantio e 50% em cobertura aos 30 DAE.

³ valores com a mesma, na coluna, não diferem a nível de 5%, pelo teste de Duncan.

⁴ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 1.21. Efeito da aplicação de inseticidas nas sementes de soja, cv. conquista, juntamente com inoculante no N° e massa de nódulos secos, N total nos grãos e rendimento de grãos de soja. Experimento conduzido em Lucas do Rio Verde, MT, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Embrapa Soja, 2002.

Treatamentos	NN ³ /pl	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos Mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ⁴ kg.ha ⁻¹
Sem inoculação	11 d	43 c	62a	74a	1181ab
Inoculação padrão (IP) ¹	27a	74ab	62a	71ab	1158ab
IP + 200 kg de N ²	21 c	59 b	61a	76a	1233a
Standak (200ml/50kg) + IP	26ab	74ab	63a	68ab	1087ab
Cruiser (150ml/50kg) + IP	23 bc	70ab	61a	62 b	1014 b
Gaúcho (175 ml/50 kg) + IP	20 c	77a	62a	74a	1196ab
CV	15,5	20,5	2,0	12,1	12,3

¹ 300 ml de água açucarada mais 500g (por 50 kg de semente) de inoculante turfoso, contendo as estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019, com população de células de $1,7 \times 10^{10}$ por grama de inoculante;

² N aplicado na fonte Ureia, sendo 50% no plantio e 50% em cobertura aos 30 DAE;

³ valores com a mesma, na coluna, não diferem a nível de 5%, pelo teste de Duncan;

⁴ rendimento corrigido para 13% de umidade.

1.2.4 Interação inoculante, micronutriente, fungicida e inseticida

Logicamente que seria impossível estudar interações entre todos esses fatores. Entretanto, algumas foram testadas, na safra 2001/02, em solos sem população estabelecida de Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT (Tabela 1.22). A aplicação do inoculante turfoso (A1) aumentou o número de nódulos de 9,7 nódulos para 29 nódulos, em Jaciara, e de 8 para 27,8, em Lucas do Rio Verde, e a aplicação do inoculante líquido (A2) aumentou o número de nódulos 9,7 para 22,8, em Jaciara, e de 8,0 para 14,5 nódulos, em Lucas. De modo similar, aumentou-se, para esses mesmos tratamentos, a massa de nódulos secos. Ao comparar os dois inoculantes (A1 e A2), verifica-se, em Lucas do Rio Verde, que o inoculante turfoso teve desempenho bem superior ao inoculante líquido utilizado. A aplicação do inoculante turfoso com os micronutrientes (Mo + Co) na forma de sal (A1 + B2) e de um produto comercial (A1 + B3) mostrou que, em Jaciara, o produto comercial afetou a nodulação e, em Lucas, nenhuma das formas de aplicar micronutriente nas sementes (sais ou produto comercial) afetaram a nodulação. Quando o inoculante líquido foi utilizado (A2 + B2 e A2 + B3) no solo de Jaciara, foram os sais que reduziram a nodulação e no solo de Lucas nenhum dos produtos reduziu a nodulação, quando em comparação com a aplicação dos micronutrientes foliar aos 30 DAE (A1 + B1) e (A2 + B1), respectivamente para inoculante turfoso e líquido. Quando, além dos micronutrientes (B2 e B3) aplicaram-se os fungicidas Carboxin + Thiram (C) antes da inoculação com o inoculante turfoso, a redução do número de nódulos foi significativa para as três formas de aplicação de micronutrientes para os solos de Jaciara e Lucas. Por outro lado, a massa de nódulos não foi afetada quando os micronutrientes foram em aplicação foliar, aos 30 DAE (A1 + B1 + C), e quando utilizou-se um produto comercial como fonte de micronutrientes aos invés dos sais, tratamento (A1 + B3 + C), em comparação com o tratamento (A1 + B1). Distintamente da safra anterior, quando, além dos fungicidas, aplicou-se o inseticida Standak nas sementes antes da inoculação com o inoculante turfoso, houve redução do número de nódulos nos dois solos, independente da fonte e da forma de aplicação dos micronutrientes.

TABELA 1.22. Efeito da aplicação de micronutrientes, fungicidas, inseticidas e da inoculação da soja, cv conquista, na nodulação (número e massa seca), N total nos grãos e rendimento de grãos. Experimento conduzido em solos sem população estabelecida de Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT, safra 2001/02. Média de seis repetições. Embrapa Soja. 2002.

Tratamentos	Jaciara		Lucas do Rio Verde	
	N°N/pl.	MSN (mg/pl.)	N°N/pl.	MSN (mg/pl.)
Sem inoculação	9,7	61	8,0	44
A1 + 200 kg N/ha	15,7	60	22,0	51
A1 + B1	29,0	108	27,8	65
A1 + B2	26,2	103	27,2	59
A1 + B3	23,7	80	30,5	42
A2 + B1	22,8	88	14,5	55
A2 + B2	24,3	89	11,8	36
A2 + B3	25,8	101	11,2	37
A1 + B1 + C	24,5	102	16,5	47
A1 + B2 + C	23,0	90	10,7	27
A1 + B3 + C	22,7	101	16,3	42
A1 + B1 + C + D	20,3	80	16,8	49
A1 + B2 + C + D	16,8	78	13,0	58
A1 + B3 + C + D	16,8	70	14,8	38
CV	24,6	22,8	26,3	48,1
DMS (5%) ¹	4,3	16,1	3,7	18,2

A1. Inoculante padrão turfoso na dose de 500 g/50 kg semente.

A2. Inoculação com Cell Tech na dose 150ml/50 kg semente.

B1. Co + Mo, aplicados foliar aos 30 DAE na dose de 2,5 g de Co, fonte $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 20,0 g de Mo na fonte $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

B2. Co + Mo aplicados nas sementes na mesma dose e fonte de B1;

B3. Co + Mo de uma fonte comercial, aplicados nas sementes na mesma dose de B1;

C. Fungicidas: Carboxin + Thiram, aplicados na dose recomendada nas sementes;

D. Inseticida: Standak, na dose 200 ml/50 kg semente;

¹ Diferença 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";

² rendimento corrigido para 13% de umidade.

De acordo com os resultados apresentados, à medida que se adiciona mais produtos nas sementes ocorre redução na nodulação, mesmo quando os micronutrientes são aplicados via foliar aos 30 DAE, mostrando assim que fungicidas e inseticidas, juntos, devem ser evitados.

1.2.5 Efeito do uso de sementes ricas em Mo na fixação biológica do N e rendimento da soja

As cultivares de soja BRS 133 e BRS 183, enriquecidas ou não com Mo, foram avaliadas para determinar a necessidade adicional de aplicação de Mo (20 g Mo/ha), nas sementes ou foliar. foram avaliadas a campo com os tratamentos sem adição de Mo e com aplicação de 200 kg de N/ha. O Co, dose de 2,5 g/ha, foi aplicado via foliar em todos os tratamentos. De modo geral, a aplicação adicional de Mo, via semente ou foliar, aumentou o rendimento da soja, independentemente dos teores de Mo que a semente possuía (Tabela 1.23). As sementes ricas em

TABELA 1.23. Efeito do uso de sementes ricas em Mo e de aplicações complementares de Mo, no rendimento de grãos de soja, cv BRS 133 e BRS 154. Embrapa Soja, 2002.

Tratamento	BRS 133 ¹		BRS 183 ²	
	P	R	P	R
1 - IP	3334	3484	3084	3057
2 - IP + Mo, semente (20g)	3541	3554	3223	3162
3 - IP + Mo, foliar (20g)	3415	3423	3162	3260
4 - IP + 2 + 3	3440	3529	3080	3200
5 - IP + Mo, foliar (10g) em V4	3378	3527	3165	3168
6 - IP + Mo, foliar (10g) em R1	3406	3597	3036	3077
7 - IP + 5 + 6	3443	3531	3057	3053
8 - IP + 2 + 5	3563	3476	3158	3232
9 - IP + 2 + 5 + 6	3602	3602	3118	3207
10 - IP + 200 kg de N	3603	3668	3297	3272
Média	3473	3539	3138	3170

¹. Sementes de soja BRS 133 com 7 µgMo/g semente (P) e com 91 µgMo/g semente (R).

². Sementes de soja BRS 153 com 24 µgMo/g semente (P) e com 87 µgMo/g semente (R).

Mo (BRS 133, 91 $\mu\text{gMo/g}$ semente e BRS 183, 87 $\mu\text{gMo/g}$ semente, apresentaram ligeiros aumentos de rendimento em relação às sementes pobres em Mo, BRS 7 $\mu\text{gMo/g}$ semente e BRS 183 24 $\mu\text{gMo/g}$ semente. Esses aumentos não foram tão significativos, como nas safras anteriores, porque as sementes pobres utilizadas apresentaram altos teores de Mo, especialmente a BRS 183.



ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA

Nº do Projeto: 04.2001.338 **Líder:** Mariangela Hungria

Nº de subprojetos que compõem o projeto: 06

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja, Embrapa Trigo, Embrapa Agrobiologia

A soja (*Glycine max*) pode suprir suas necessidades de N pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2), realizado pela simbiose com bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. Com os novos patamares de produtividade atingidos pela cultura no Brasil, porém, torna-se necessário desenvolver diversas linhas de pesquisa para incrementar os níveis de fixação biológica encontrados atualmente. Nesse contexto, este projeto reúne as instituições Embrapa Soja, Embrapa Trigo e Embrapa Agrobiologia para desenvolver projetos em algumas dessas linhas de pesquisa. Em relação à avaliação da reinoculação em áreas com populações estabelecidas de *Bradyrhizobium*, em 2000/01, no subprojeto 04.2001.338.01 ("Identificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* mais eficientes e competitivas para a cultura da soja e avaliação das respostas à reinoculação em áreas com populações estabelecidas distintas de *Bradyrhizobium*"), coordenado pela Dra. Mariangela Hungria, da Embrapa Soja, foram conduzidos nove experimentos, nos sistemas de semadura direta (SD) e convencional (SC), em solos com no mínimo 10^3 células g^{-1} de solo, em Londrina e Ponta Grossa (PR) e Jaciara (MT), com tratamentos que incluíram, além da inoculação, controles não inoculados, recebendo ou não fertilizantes nitrogenados. A reinoculação aumentou significativamente o rendimento no MT, indicando a necessidade desse procedimento, particularmente em condições de estresse ambiental, como temperatura elevada e baixa umidade do solo. Nos três locais constatou-se que a adubação nitrogenada da cultura da soja, na semeadura (30 kg ou 100 kg de N), no florescimento (50 kg ou 100 kg de N) ou no enchimento dos grãos (50 kg de N), não resultou em incrementos no rendimento, sendo, portanto, desnecessária, pois implica em aumento

de custo para o agricultor, sem resultar em qualquer retorno econômico. É importante salientar que a falta de resposta à complementação com fertilizante nitrogenado ocorreu tanto no sistema de SD, como em SC. Ainda em 2000/01, no subprojeto 04.2001.338.06 ("Contribuição do N derivado da fixação biológica do nitrogênio para a produtividade da soja e para o balanço de N do sistema solo-planta", coordenado pelo Dr. Segundo Sacramento Urquiaga Caballero, da Embrapa Agrobiologia), também foi avaliado o efeito de diferentes doses de N (0, 30 e 60 kg ha⁻¹ de N) e gesso sobre a produção da soja. A massa seca total (incluindo raízes) acumulada foi maior no sistema SD do que no SC, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas para o conteúdo total de N acumulado nas plantas em função dos tratamentos de doses de N, gesso e sistema de semeadura. Quando a contribuição da fixação biológica foi estimada pela técnica de N-ureídeos e delta-¹⁵N, verificou-se maior contribuição na SD do que na SC, embora sem afetar os rendimentos; além disso, o efeito inibitório do N-fertilizante foi superior na SC. Em baixas doses de N-fertilizante (30 kg de N ha⁻¹), a eficiência de recuperação do ¹⁵N-fertilizante foi maior na SC (87%) do que na SD (48%), provavelmente pela imobilização elevada pela microbiota do solo, enquanto que, com 60 kg de N ha⁻¹, os valores constatados foram de 60% e 70%, respectivamente. No estágio V3, estudos preliminares realizados em vasos com a técnica de marcação foliar de soja com ¹⁵N indicaram, ainda, que cerca de 34% do N total da planta estão contidos na parte subterrânea da cultura. A análise dos resultados obtidos no subprojeto 04.2001.338.05 ("Contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja em áreas de produção do País", coordenado pelo Dr. Bruno José Rodrigues Alves, da Embrapa Agrobiologia) confirmaram correlação entre as técnicas de N-ureídeos e a de abundância natural de ¹⁵N ($r^2 = 0,65$), portanto, ambas podem fornecer um indicador da proporção do N proveniente da fixação biológica e acumulado pela cultura da soja. Ainda nesse subprojeto, houve indicação de que o cultivo da soja em áreas tradicionalmente voltadas para a produção dessa cultura, sob sistema com mínimo revolvimento do solo e/ou com um estande estabelecido com maior densidade de plantas possível, são estratégias que podem otimizar a contribuição da fixação biológica. Levantamentos sobre a contribuição da fixação biológica em propriedades agrícolas com distintos históricos também foram realizados no projeto 04.2001.338.05, mas poucas planilhas

retornaram, não tendo sido possível detectar efeito de diferentes sistemas de cultivo. No ano de 2002, no subprojeto 04.2001.338.01, realizaram-se estudos visando compreender as alterações que ocorrem na população de rizóbio em áreas inoculadas, bem como estudos de caracterização genética de estirpes de *Bradyrhizobium*, que serão relatadas neste volume. Ainda em relação à inoculação com bactérias, o subprojeto 04.2001.338.03 ("Microorganismos associativos promotores do crescimento de soja", coordenado pelo Dr. Alexandre José Cattelan, da Embrapa Soja) visa obter isolados de bactérias rizosféricas promotoras do crescimento da soja (BPCS), para serem utilizadas em conjunto com *Bradyrhizobium*. Nesse subprojeto foram caracterizados, *in vitro*, diversos isolados quanto à solubilização de fosfato, produção de ACC deaminase, produção de ácido indol acético e antagonismo aos fungos patogênicos *Fusarium solani* e *Phiallophora gregata*. Esses isolados foram testados em casa de vegetação para controle da podridão vermelha da raiz e para promoção do crescimento de plantas de soja. Para cada um dos testes realizados, pelo menos um isolado apresentou as condições almejadas nos objetivos desse subprojeto, totalizando 20 isolados, que foram qualificados como promotores do crescimento de soja. Em 2001/02, foram conduzidos ensaios em casa de vegetação e a campo com esses isolados, que também serão relatados neste volume. Pelo projeto 04.2001.338.04 ("Avaliação da inoculação com *Bradyrhizobium* e com bactéria promotora de crescimento de plantas em soja, no norte do Rio Grande do Sul", coordenado pelo Dr. Marcio Voss, da Embrapa Trigo) foram instalados, em 2000/01, dois experimentos, no RS, com estirpes de *Bradyrhizobium* e BPCS, mas não foi constatado nenhum benefício pela inoculação com nenhuma das bactérias. Em 2001/02 os ensaios foram repetidos no RS e em SC e um terceiro ensaio foi conduzido, para verificar os efeitos de BPCPs na podridão parda da haste de soja, mas os resultados ainda não estão disponíveis. Finalmente, em relação à planta hospedeira, no subprojeto 04.2001.338.02 ("Microorganismos associativos promotores do crescimento de soja", coordenado pela Dra. Mariangela Hungria, da Embrapa Soja), quando 152 cultivares de soja foram inoculadas com a estirpe de *B. japonicum* SEMIA 5080 foram constatadas diferenças significativas entre as mesmas na capacidade de fixação de N₂, mas não houve restrição à nodulação em nenhuma das cultivares. Também foi avaliado o desempenho de cultivares transgênicas em relação à FBN com as estir-

pes utilizadas em inoculantes comerciais. Foram realizadas, ainda, as análises genéticas de um experimento envolvendo 12 dialelos completos, entre materiais contrastantes para a FBN: J-200 e Bossier (alta FBN), Embrapa 20 (média) e BRS 133 (baixa), sendo determinados diversos parâmetros. As estimativas de herdabilidade no senso restrito variaram de 39% a 77%, com valores em geral superiores a outros relatados na literatura. A predição do potencial genético de obtenção de linhagens superiores para a fixação do N_2 indicou que os cruzamentos mais efetivos seriam Bossier x Embrapa 20 e Embrapa 20 x BRS 133. Esse último foi, então, utilizado para a busca de marcadores moleculares do tipo QTLs (Quantitative Trait Loci, locos controladores de característica quantitativa), e os resultados obtidos estão relatados neste volume.

2.1 Identificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* mais eficientes e competitivas para a cultura da soja e avaliação das respostas à reinoculação em áreas com populações estabelecidas distintas de *Bradyrhizobium* (04.2001.338-01)

Mariana Gomes Germano¹; Lygia Vitoria Galli-Terasawa²;
Ligia Maria de Oliveira Chueire; Mariangela Hungria;
Eliane Villamil Bangel³; Rubens José Campo

2.1.1 Diversidade de uma população de *Bradyrhizobium* adaptada a um solo dos Cerrados

Este estudo foi conduzido com a finalidade de compreender as modificações que ocorrem em uma população de *Bradyrhizobium* introduzida via inoculantes em um solo dos Cerrados, no traçado de estratégias para maximizar as respostas à reinoculação.

¹ Aluna de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

² Aluna de Doutorado e Profa. do Depto. de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

³ FEPAGRO, Porto Alegre.

Estirpes-referência de *Bradyrhizobium japonicum*/B. elkanii - Foram consideradas, como referência, as seguintes estirpes, que representam praticamente 100% da população estabelecida em solos brasileiros cultivados com a soja: *B. japonicum* SEMIA 566, SEMIA 586 (=CB 1809), SEMIA 5079 (=CPAC 15, mesmo sorogrupo da SEMIA 566) e SEMIA 5080 (=CPAC 7, mesmo sorogrupo da SEMIA 586) e *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 (=29w).

Isolados de soja - Foram obtidas amostras de solo, coletadas ao acaso na profundidade de 0 a 20 cm, de uma área típica dos Cerrados, no Distrito Federal. Vinte subamostras foram retiradas assepticamente, misturadas e colocadas em um saco de plástico estéril. A área havia recebido inoculante há 15 anos, vinha sendo cultivada anualmente com a soja desde então, mas não havia recebido inoculantes nos últimos sete anos. O inoculante que a área recebeu anteriormente continha as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. As amostras passaram por peneira de 4 mm e foram divididas para determinação da umidade, propriedades químicas e para o isolamento das estirpes. As propriedades químicas do solo indicaram: pH em CaCl_2 , 3,87; N (%), 0,16; Al (%), 83; saturação de bases (%), 2,1; C (%), 2,42; P (mg.dm^{-3}), 0,6. A população de rizóbio foi avaliada pela técnica do número mais provável com contagem em plantas de soja e estimada em 10^4 células g^{-1} de solo. Sementes de soja, cv. BR 37, foram desinfectadas superficialmente e germinadas por dois dias. Duas plântulas foram colocadas em cada vaso estéril do tipo "Leonard" e cada uma recebeu 500 μL de uma solução 10^{-1} de solo (em 0,85% p/v de NaCl, agitado com pérolas de vidro por 30 min.), com 40 repetições. Cem nódulos, coletados de 45 plantas foram retirados ao acaso, aos 35 dias após a semeadura. As bactérias foram isoladas dos nódulos, usando métodos microbiológicos tradicionais, buscando-se um único tipo de colônia para cada isolado, os quais foram reinoculados na cultivar BR 37, para confirmar a efetividade. Noventa e sete isolados confirmaram efetividade e foram usados neste estudo.

Caracterização dos isolados - Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia da colônia (cor, produção de exopolissacarídeos, diâme-

tro, forma, bordas, elevação) e reação ácida ou alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. A aglutinação somática de cada isolado foi testada contra os antissoros das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 587 e SEMIA 5019. Os perfis de proteína e de lipopolissacarídeos dos isolados também foram determinados. Para a caracterização genética, o DNA dos isolados foi extraído e amplificado pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com os oligonucleotídeos BOX, de regiões repetitivas do genoma, e RPO1, da região dos genes *nif*, relacionada à fixação biológica do nitrogênio. Os géis foram fotografados e analisados com o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium), com o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Jaccard (J).

Propriedades simbióticas - Sementes da cultivar BR 37 foram inoculadas individualmente com cada isolado em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard. As plantas foram coletadas aos 45 dias após a semeadura, para avaliação do número e da massa de nódulos secos, bem como a massa seca e o N total (N-Kjeldahl) acumulado na parte aérea. O experimento foi conduzido no delineamento de blocos ao acaso, com três repetições e os dados foram analisados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para avaliar a especificidade hospedeira, os isolados foram utilizados como inoculantes para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar IAPAR 14.

Resultados obtidos - Foi constatada variabilidade morfológica elevada entre os 97 isolados estudados (dados não mostrados) e 28 se caracterizaram pelo crescimento rápido e reação ácida em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. Estirpes de crescimento rápido já foram isoladas de nódulos de soja nos países asiáticos, centros de origem dessa leguminosa, sendo identificadas como pertencentes às espécies *Sinorhizobium fredii* e *S. xinjiangensis*. No Brasil e no Paraguai, também já foi relatado o isolamento de estirpes de crescimento rápido, mas essas foram classificadas como *Rhizobium tropici*, que é microssimbionte do feijoeiro. Neste estudo, porém, os isolados com crescimento rápido compartilharam diversas características com

as quatro estirpes de *Bradyrhizobium* usadas em inoculantes comerciais brasileiros.

Uma característica inesperada da população foi a reação sorológica múltipla, com 48% dos isolados reagindo contra dois ou mais antissoros (Tabela 2.1). Conforme esperado, as estirpes usadas como inoculante representaram a maioria das reações, com 48 isolados reagindo contra a SEMIA 587 e 37 contra a SEMIA 5019. Contudo, deve-se salientar que 36 isolados reagiram contra a SEMIA 566, que foi usada em inoculantes comerciais de 1966 a 1978, particularmente na Região Sul do Brasil e, desde 1992, uma variante dessa estirpe, a SEMIA 5079, tem sido largamente utilizada nos Cerrados. A dispersão de estirpes já foi relatada no Brasil e, em associação com a capacidade saprofítica elevada da SEMIA 566, explicaria a ocupação dos nódulos por essa estirpe, que não havia sido usada como inoculante nessa área. Finalmente, 37% das estirpes não reagiu a nenhum dos antissoros testados (Tabela 2.1).

A análise com maior poder de discriminação foi a da determinação do perfil de proteína (PP), com 12 diferentes perfis. O PP-III representou 23% dos isolados e os outros perfis incluíram de três a nove estirpes (Fig. 2.1). Embora tenham sido observados sete perfis diferentes de lipopolissacarídeos, 70% dos isolados foram agrupados no LPS-II (Fig. 2.1). O LPS-II incluiu isolados de todas as classes de sorogrupos, exceto aquela com reação mista com os antissoros das SEMIA 5019 e SEMIA 566 (Tabela 2.1). O nível elevado de diversidade fica evidente ao analisar a Tabela 2.1, em que várias combinações de sorogrupos e perfis de PP e LPS são mostrados, constatando-se que o maior agrupamento desses parâmetros inclui apenas cinco isolados (sorogrupo SEMIA 587 com PP-III e LPS-II).

Em relação ao desempenho simbiótico, avaliado pela inoculação dos isolados na cultivar BR 37, foi constatada distribuição normal para os parâmetros de número de nódulos, massa de nódulos e da parte aérea seca, %N e N total da parte aérea (dados não mostrados). Dentre os 27 isolados que apresentaram melhor desempenho simbiótico, dez reagiram com o antissoros da SEMIA 586 (dados não mostrados), confir-

TABELA 2.1. Reação sorológica, perfil de proteínas e de lipopolissacarídeos em cada sorogrupo de 97 isolados de rizóbio de nódulos de soja inoculada com um solo da região dos Cerrados.

Nº de isolados	Sorogrupo	Perfil de proteínas (PP)	Perfil de lipopolissacarídeos (LPS)	Combinação dominante de PP-LPS (% de isolados dentro de cada classe do sorogrupo)
11	SEMIA 587	I, III, VII, IX, XI	I, II, III, V	III-II (45,4%)
09	SEMIA 5019	I, II, III, VIII, IX, XI	I, II, IV	II-I (22,2%)
12	SEMIA 566	I, III, VII, X, XI, XII	II	I-II e X-II (16,6%)
05	SEMIA 586	V, VI, VIII, XII	II	XII-II (40%)
20	SEMIA 587 + 5019	I, III, V, VI, VII, IX, X, XII	II, IV, V, VI, VII	III-II, VI-IV, IX-V, IX-II (10%)
10	SEMIA 587 + 566	I, II, III, IV, V, X, XII	I, II, III, VI	nenhum
01	SEMIA 587 + 586	X	II	não considerado
03	SEMIA 5019 + 566	II, IV, XI	I	nenhum
07	SEMIA 566 + 586	III, IV, V, VII, VIII, IX	II	VII-II (28,5%)
02	SEMIA 587 + 5019 + 566	VI, X	II	nenhum
01	SEMIA 587 + 566 + 586	III	II	não considerado
03	SEMIA 587 + 5019 + 566 + 586	III, V	II, VI	nenhum
13	sem reação	I, II, III, V	I, II, IV	III-II (30,8%)

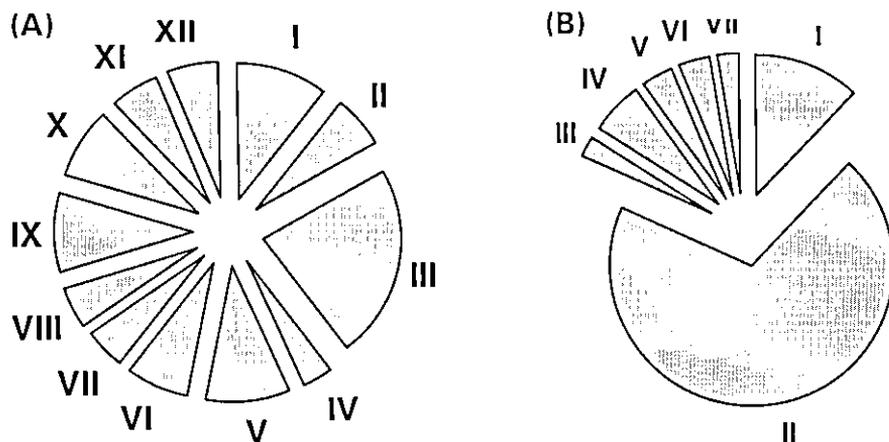


FIG. 2.1. Percentual de distribuição dos perfis de proteína (A) e de lipopolissacarídeos (B) em uma população de rizóbios isolados de soja inoculada com um solo dos Cerrados.

mando a capacidade elevada de fixação biológica de nitrogênio desse sorogrupo. Dentro os 20 isolados com pior desempenho, nove reagiram com o sorogrupo SEMIA 5019 e sete com o SEMIA 587 (dados não mostrados). Uma característica interessante foi a capacidade de diversos isolados, particularmente aqueles com reação ácida, de formarem pseudo-nódulos no feijoeiro.

Um nível elevado de diversidade genética foi constatado pela amplificação do DNA dos isolados pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com os oligonucleótidos BOX (regiões conservadas e repetitivas do DNA) e RPO1 (região dos genes *nif*). Com o BOX, foram formados dois grandes agrupamentos, unidos em um nível de similaridade de 20% (Fig. 2.1A), enquanto que com RPO1 essa similaridade foi de 23% (Fig. 2.1B). Na análise com o BOX, os dois grupos principais não foram relacionados à reação ácida ou alcalina em meio de cultura com manitol, contudo, vários agrupamentos mostraram relação com os sorogrupos; esta relação não foi evidenciada com o oligonucleotídeo RPO1 (dados não mostrados). A variabilidade genética foi maior com o oligonucleotídeo RPO1, indicando transferência de genes

simbióticos nessa população. Isso fica mais evidenciado pela constatação de que vários isolados ficaram posicionados em agrupamentos bastante distintos, nas análises com os oligonucleotídeos BOX e RPO1 (Fig. 2.2). Como exemplo, os quatro primeiros isolados no agrupamento com o oligonucleotídeo BOX foram posicionados em grupos totalmente distintos, quando a região *nif* foi considerada. Quando os produtos de PCR obtidos com ambos os oligonucleotídeos foram considerados, a diversidade genética elevada foi confirmada, uma vez que os isolados se uniram em nível muito baixo de similaridade, de apenas 23% (dados não mostrados). Esses resultados evidenciam que a população de rizóbio capaz de nodular a soja apresentou alta variabilidade morfológica, fisiológica e genética após a introdução de duas estirpes inoculantes e o cultivo com a planta hospedeira por vários anos. Foi constatada dispersão de estirpes inoculantes provenientes de outras áreas cultivadas, bem como variabilidade em função da adaptação aos solos. Contudo, houve também indicação de transferência lateral de genes entre as estirpes inoculadas e rizóbios nativos dos Cerrados, evidenciada por: 1) um terço das estirpes apresentou crescimento rápido e reação ácida em meio de cultura, mas manteve diversas características das estirpes inoculantes; 2) posicionamento distinto das estirpes quando foram consideradas regiões conservadas e repetitivas do DNA e regiões dos genes *nif*, relacionados à fixação biológica do nitrogênio. Ao contrário do que ocorre nos Estados Unidos, nos Cerrados são freqüentes os relatos de respostas à reinoculação, mesmo em áreas com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. É possível que a variabilidade encontrada na população de rizóbio desempenhe papel como tampão biológico, evitando a dominância de determinadas estirpes pouco eficientes e muito competitivas.

2.1.2 Caracterização genética de estirpes de *Bradyrhizobium*

A família Leguminosae (Fabaceae nos Estados Unidos) inclui cerca de 18.000 espécies de plantas, que são classificadas em mais de 650 gêneros, representando uma das maiores famílias de plantas superiores e que ocupam quase todos os biomas terrestres. Várias espécies

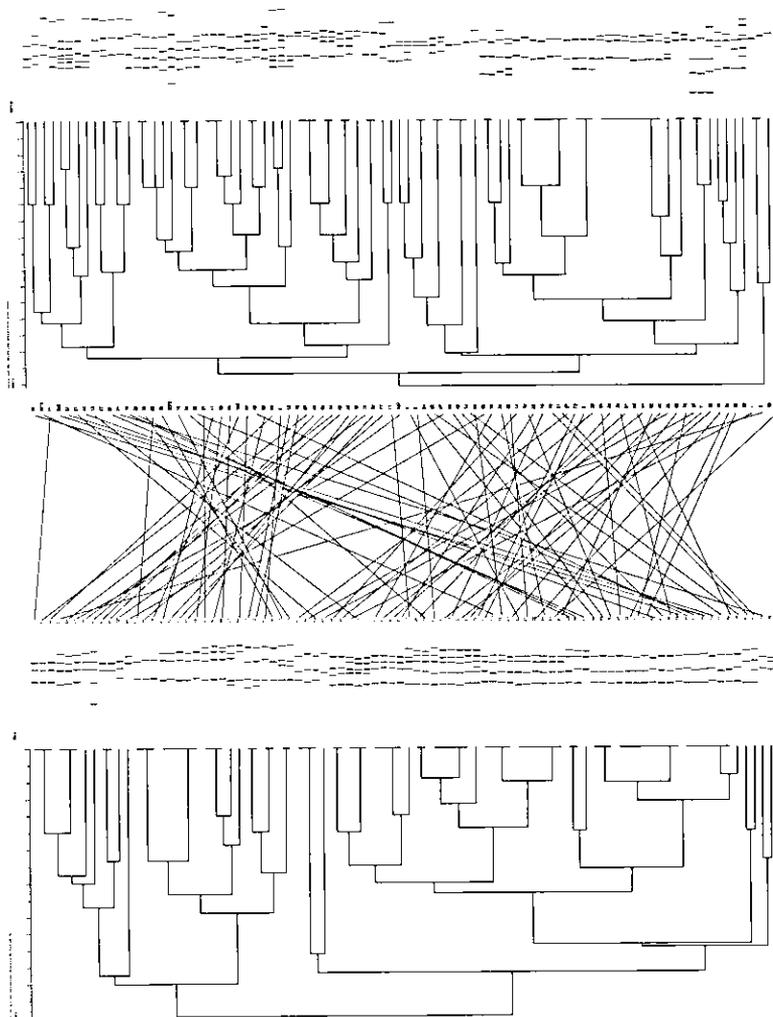


FIG. 2.2. Dendrograma mostrando os perfis de DNA dos isolados dos Cerrados, bem como de estirpes representativas de *Bradyrhizobium japonicum* (586 e 5079) e *B. elkanii* (587 e 5019), após a amplificação por PCR com os oligonucleotídeos (A) BOX e (B) RPO1. Análise utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard e as linhas indicam a posição relativa de cada isolado em ambos dendrogramas.

nessa família são capazes de estabelecer simbioses eficientes com os rizóbios, sendo reconhecidos, hoje, cinco gêneros, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (recentemente foi sugerido que o gênero *Allorhizobium* não deveria ser considerado como um novo gênero, mas sim como *Rhizobium*). *Bradyrhizobium* é considerado como o ancestral de todos os rizóbios e a maioria das estirpes tropicais apresenta propriedades típicas desse gênero. Contudo, embora tenham sido detectadas grandes diversidades morfológica, fisiológica e genética entre estirpes de *Bradyrhizobium* no Brasil, não há praticamente informação sobre variabilidade na região dos genes ribossomais 16S rRNA (gene mais utilizado para taxonomia de bactérias e que compreende, aproximadamente, 1.500 pares de bases). Desse modo, este estudo teve, por objetivo, analisar geneticamente diversas estirpes de *Bradyrhizobium*, através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-PCR dos genes ribossomais 16S rRNA.

Foi analisada uma coleção de estirpes de *Bradyrhizobium* provenientes da coleção de culturas de rizóbios da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS), da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE) e do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa, Manaus, AM). As estirpes foram caracterizadas em meio contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA). As bactérias foram mantidas na coleção de rizóbios da Embrapa Soja a -70°C (YMA com glicerol) e a 4°C (culturas de trabalho).

Para amplificar a região do 16S rRNA foram utilizados os "primers" fD1 (3'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-5') e rD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). Cada repetição consistiu, em um volume final de 50 µl (concentração final entre parênteses): dNTPs (300 µM de cada); 5,0 µL de tampão 10 X; MgCl₂ (1,5 mM); oligonucleotídeos (15 pmol de cada); Taq DNA polimerase (1,25 U); DNA (20 ng); DMSO (5%); água estéril milli-Q para completar o volume. A reação foi conduzida em um termociclador MJ Research Inc. PTC 200, com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min.; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s., 93°C por

45 s., anelamento a 55°C por 45 s., e extensão a 72°C por 2 min.; um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min.; e os tubos foram mantidos a 4°C. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *CfoI*, *MspI* e *DdeI*, (Invitrogen - Life Technologies), conforme recomendado pelo fabricante. Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%, a 100V, por 4 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação UV. Os produtos de PCR foram analisados pelo método de UPGMA (unweight pair group method, with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard, utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica).

Ao todo, foram caracterizadas 113 estirpes de *Bradyrhizobium* (dados não mostrados), isoladas de 31 espécies de leguminosas, representando nove tribos e incluindo as três subfamílias da família Leguminosae (Tabela 2.2). Sabe-se que a nodulação ocorre, principalmente, nas subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae, sendo raros na Caesalpinioideae e, de fato, somente uma estirpe, SEMIA 6099, foi isolada de *Dimorphandra exaltata*, pertencendo a essa subfamília. Das estirpes analisadas, 41 são recomendadas para uso em inoculantes comerciais para diversas leguminosas.

Tem sido relatado, freqüentemente, que, embora sejam constatadas variabilidades morfológica, fisiológica e genética elevadas entre estirpes de *Bradyrhizobium*, a região do gene 16S rRNA não reflete essa diversidade. Neste estudo, a amplificação com os genes *fD1* e *rD1* produziu, em todas as estirpes, um único fragmento, com aproximadamente 1.500 pares de bases. Quando esse fragmento foi digerido com três enzimas de restrição e os fragmentos foram analisados em conjunto, constatou-se grande variabilidade genética, conforme pode ser visualizado na Figura 2.3, e a formação de três grandes grupos. O primeiro agrupamento reuniu as estirpes de referência de *B. japonicum*, com nove subgrupos distintos (I a IX), em quatro deles (subgrupos II, V, VI, e VIII), as estirpes reuniram-se às estirpes de referência SEMIA 5080 e 5056, 566, 586 e 5079 e 5085, respectivamente. A grande maioria das estirpes presentes neste grande grupo teve, como planta hospedeira, a soja. O subgrupo I apresentou estirpes com similaridade

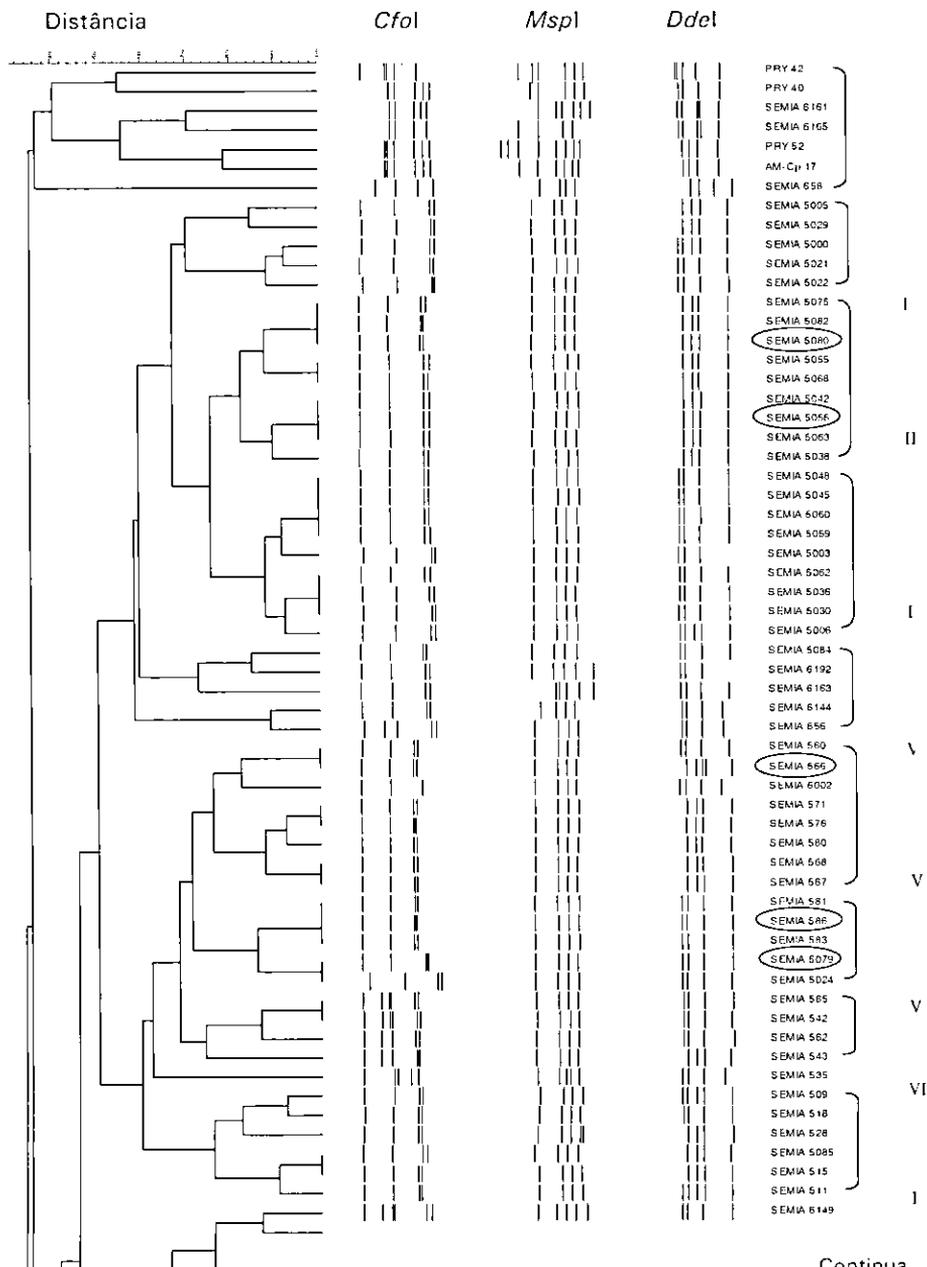
TABELA 2.2. Espécies e subfamílias de hospedeiros das estirpes de *Bradyrhizobium* que foram caracterizadas geneticamente.

Espécie de planta*	Subfamília	Tribo
<i>Acacia auriculiformis</i> Benth.	Mimosoideae	Acacieae
<i>Acacia mangium</i> Willd	Mimosoideae	Acacieae
<i>Acacia mearnsii</i> De Wild	Mimosoideae	Acacieae
<i>Aeschynomene americana</i> L.	Papilionoideae	Aeschynomeneae
<i>Albizia falcataria</i> (synonymous of <i>Falcataria moluccana</i> (Miq.) Barneby & Grimes)	Mimosoideae	Ingeae
<i>Albizia lebbek</i> (L.) Benth.	Mimosoideae	Ingeae
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Papilionoideae	Aeschynomeneae
<i>Arachis</i> spp.	Papilionoideae	Aeschynomeneae
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Calopogonium</i> spp.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Centrosema pubescens</i> Benth.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Centrosema</i> spp.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Clitoria ternatea</i> L.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Crotalaria juncea</i> L.	Papilionoideae	Crotalariaeae
<i>Crotalaria spectabilis</i> Roth	Papilionoideae	Crotalariaeae
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell. Conc.) Benth.	Papilionoideae	Dalbergieae

Continua...

Espécie de planta *	Subfamília	Tribo
...Continuação Tabela 2.1		
<i>Desmodium ovalifolium</i>	Papilionoideae	Desmodieae
<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.) DC.	Papilionoideae	Desmodieae
<i>Dimorphandra exaltata</i> Schott	Caesalpinioideae	Caesalpinieae
<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	Mimosoideae	Ingeae
<i>Galactia striata</i> (Jacq.) Urban	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Leucaena leucocephala</i>	Papilionoideae	Crotalarieae
<i>Lotononis bainesii</i> Baker	Mimosoideae	Mimosaeae
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.	Mimosoideae	Mimosaeae
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Neonotonia wightii</i> (Wight & Arn.) Lackey	Mimosoideae	Mimosaeae
<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	Papilionoideae	Phaseoleae
<i>Stylosanthes</i> spp.	Papilionoideae	Aeschynomeneae
<i>Tipuana tipa</i> (Benth.) Kuntze	Papilionoideae	Dalbergiaeae
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Papilionoideae	Phaseoleae

* As estirpes isoladas de *Glicíndia sepium*, *Leucaena leucocephala* e *Sesbania virgata* não mostraram as propriedades características de *Bradyrhizobium*, portanto não foram incluídas nesta lista.



Continua...

...Continuação Figura 2.3

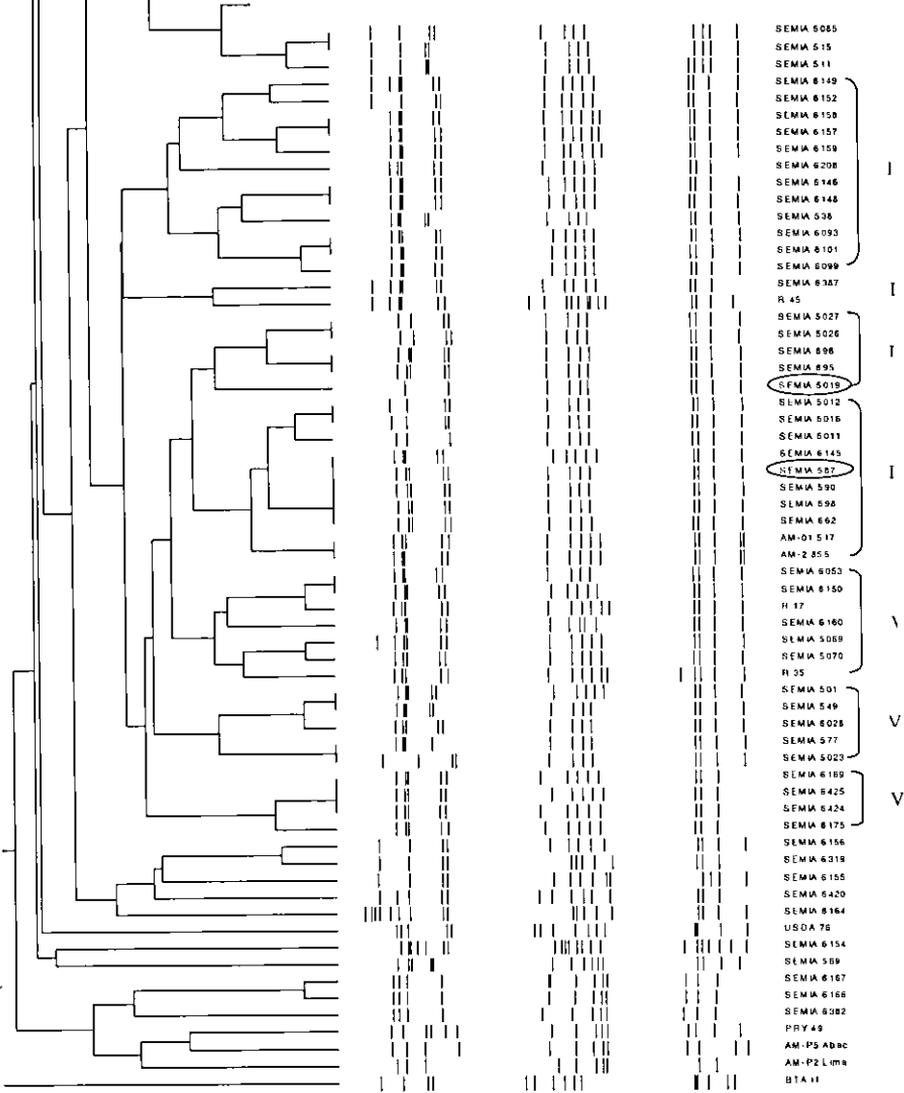


FIG. 2.3. Dendrograma de estirpes de *Bradyrhizobium* obtido com os fragmentos resultantes da análise por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-PCR (Polymerase Chain Reaction) da região ribossomal do gene 16S rRNA com três enzimas de restrição. Análise usando o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard.

entre 70,25% e 92,31% entre si e todas as representantes também demonstraram relação com a planta hospedeira (soja).

O subgrupo II mostrou-se bem relacionado às estirpes de referência SEMIA 5080 e 5056 (=USDA 6, estirpe tipo para a espécie *B. japonicum*) e uniu-se ao subgrupo I em um nível de similaridade de 67,21%. As estirpes SEMIA 5075, 5082 e 5080 apresentaram 100% de similaridade entre si e uniram-se às estirpes SEMIA 5055 e 5068 (também com 100% de similaridade entre si), no nível de similaridade de 87,92%, bem como as estirpes SEMIA 5042 e 5063, que uniram-se à estirpe padrão SEMIA 5056 com 100% de similaridade. No subgrupo III, as estirpes SEMIA 5048, 5045, 5060 e 5059 mostraram similaridade total entre si, além das estirpes SEMIA 5036, 5030 e 5062, também unidas com 100% de similaridade. Este subgrupo uniu-se ao subgrupo II, em um nível de 75,61% de similaridade, demonstrando, portanto, maior semelhança com as estirpes do subgrupo II, em relação ao subgrupo I. Um quarto subgrupo distinto (IV), unido aos demais a um nível de similaridade relativamente baixo, de apenas 59,21%, mostrou-se mais heterogêneo quanto às estirpes representantes, em relação aos grupos anteriores, com estirpes isoladas de *Tipuana tipa* e *Acacia mearnsii* agrupadas à estirpe SEMIA 5084, isolada da soja. Da mesma forma, o subgrupo V apresentou-se bastante heterogêneo em relação aos demais subgrupos, com duas estirpes representantes (SEMIA 6144 e 656), isoladas de *Arachis hypogaea* e *Neotonia wightii*, agrupadas entre si com 88,89% de similaridade e unido aos grupos anteriores em um nível de 58,69%. O subgrupo VI mostrou estirpes bem relacionadas à estirpe SEMIA 566, referência para estirpes de *B. japonicum* e todas as representantes apresentaram relação com a origem dos nódulos, exceto pela estirpe SEMIA 6002, simbionte de *Vigna unguiculata*. O sétimo subgrupo (VII) demonstrou estar bem relacionado com as estirpes padrões e as estirpes SEMIA 581 e 583 apresentaram 100% de similaridade com a estirpe padrão para *B. japonicum* SEMIA 586. As estirpes SEMIA 583 e 5024 também agruparam-se em um nível de 100% de similaridade com a estirpe padrão SEMIA 5079. Este subgrupo uniu-se ao anterior com 71,21% de similaridade. No subgrupo VIII foram agrupadas quatro estirpes

SEMIA: 543, 562, 542 e 565, sendo as duas últimas semelhantes em nível de 100%, todas simbiotes de soja. A estirpe SEMIA 535 mostrou-se bastante distinta das demais estirpes do grupo, com perfis diferentes para as três endonucleases, unindo-se aos subgrupos VII e VIII, em um nível de similaridade de 62,31%. O último subgrupo (IX) demonstrou estar relacionado ao subgrupo anterior em um nível de similaridade de apenas 59,95%. As estirpes agruparam-se com a estirpe padrão SEMIA 5085 e a estirpe SEMIA 515 uniu-se a esta em um nível de similaridade de 100%. Dessa forma, foi possível observar alta correlação entre as estirpes agrupadas no primeiro grupo, bem relacionado às estirpes padrões de *B. japonicum*, com a origem dos nódulos, predominantemente de soja, além de boa correlação dos subgrupos com as estirpes de referência.

O segundo grande grupo foi associado às estirpes padrões de *B. elkanii* SEMIA 5019 e 587 e uniu-se ao grupo das estirpes representantes de *B. japonicum* em um nível de similaridade baixo, de apenas 45,1%. Esse grupo foi subdividido em sete subgrupos distintos (I a VII), que pareceram ser mais heterogêneos que os subgrupos de *B. japonicum*, particularmente em relação à origem dos nódulos. Dentro do subgrupo I, foi possível observar grande heterogeneidade entre as estirpes quanto à planta hospedeira, provenientes de diversas espécies de leguminosas simbióticas. As estirpes SEMIA 6157 e 6158 apresentaram similaridade total, sendo simbiotes de espécies de leguminosas diferentes (*Cajanus cajans* e *Crotalaria spectabilis*, respectivamente). Esse dado confirma o fato de que estirpes de rizóbios possam nodular uma extensa gama de espécies de leguminosas diferentes, mas, alternativamente, é também verdade que algumas espécies de plantas são hospedeiras para um grande número de espécies de rizóbios. A estirpe R 45, simbiote de *Cajanus cajans*, agrupou-se em 73,79% de similaridade com a estirpe SEMIA 6387 (*Acacia auriculiformis*), no subgrupo II. No subgrupo III, as estirpes SEMIA 5026 e 5027 apresentaram 100% de similaridade entre si e uniram-se em um nível de 85,45% com as estirpes SEMIA 695 e 696, também com 100% de similaridade entre si. A essas estirpes, agrupou-se a estirpe padrão SEMIA 5019 (*B. elkanii*), em nível de semelhança de 73,81%. Esse subgrupo uniu-se ao subgrupo

IV, em um nível de 68,03%, onde também foi posicionada a estirpe padrão SEMIA 587. As estirpes AM-01.517 e AM-2.855 relacionaram-se no nível de 100% de similaridade entre si, e em 81,58% com o agrupamento da SEMIA 587. As estirpes SEMIA que agruparam-se no subgrupo V, juntaram-se às estirpes R 17 e R 35, dos Tabuleiros Costeiros (SE), com perfis distintos das demais, mas agrupando-se em 72,87% de similaridade entre si. Dentro do subgrupo VI, todas as estirpes agrupadas foram simbiotes de soja, exceto pela estirpe SEMIA 6028, simbiote de *Desmodium uncinatum*. No último subgrupo (VII), três estirpes SEMIA (6169, 6424 e 6425) agruparam-se em um nível de similaridade de 100%, e a estirpe SEMIA 6175, simbiote de *Pueraria phaseoloides*, uniu-se a essas, em 86,35% de similaridade.

O último grande grupo, o mais diverso entre os três, agrupou as estirpes com os perfis de RFLP mais distintos entre todo o grupo bacteriano analisado, não apresentando nenhuma estirpe unida às demais com 100% de similaridade. Os níveis de similaridade encontrados variaram bastante entre as estirpes e poucas relacionaram-se em níveis relativamente altos (acima de 90%). Neste grupo, estão as estirpes PRY, isoladas de nódulos de soja na região da fronteira entre Brasil e Paraguai, além de diversas estirpes SEMIA, provenientes de várias leguminosas hospedeiras. Em sua maioria, as estirpes SEMIA foram isoladas de hospedeiros das tribos Mimoseae, Crotalariaeae, Aeschynomeneae, Acacieae, e uma única estirpe simbiote de soja, da tribo Phaseoleae. Entre essas estirpes, a SEMIA 6164 apresentou perfil muito distinto das demais estirpes SEMIA, unindo-se a elas em um grau de similaridade de 50,59%. Da mesma forma, as estirpes SEMIA 6154 e 569 foram bastante distintas, unindo-se com baixa similaridade, apenas 37,04%. Estirpes isoladas da Amazônia (estirpes AM) também foram posicionadas nesse grupo e apresentaram perfis bastante diversos entre si. A estirpe AM-Cp 17 uniu-se à PRY 52 com 78,95% de similaridade. As estirpes AM-P2 Lima e AM-P5 Abac agruparam-se em um nível de similaridade de 55,84% e esta uniu-se à PRY 49 em 66,67%. Ainda no terceiro grupo, encontrou-se a estirpe BTAi 1, unida às demais em um nível de similaridade baixo, de apenas 27,97%.

Embora a seqüência do gene 16S rRNA seja relativamente conservada entre os rizóbios, foi possível constatar, neste estudo, variabilidade genética elevada a partir da análise do dendrograma construído por RFLP-PCR dessa região. Dois grupos de bactérias apresentaram similaridade mais elevada com estirpes classificadas nas espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* e incluíram microssimbiontes isolados principalmente da soja. Um terceiro grupo de bactérias se distanciou geneticamente dos demais e reuniu bactérias provenientes de diversas tribos da família Leguminosae. As estirpes desse grupo podem representar uma nova espécie de *Bradyrhizobium*. Este estudo terá continuidade, procedendo-se à análise das regiões ribossomais dos genes 23S rRNA e da região intergênica 16S-23S rRNA dessas estirpes.

2.2 Desempenho simbiótico de cultivares de soja e busca de marcadores moleculares relacionados à fixação biológica do nitrogênio (04.2001.338-02)

Marisa Fabiana Nicolás¹; Mariangela Hungria; Carlos A. Arrabal Arias;
Tatiana Marianowski²; Rubens José Campo; Rubens Onofri Nodari³

2.2.1 Identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci) que controlam a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio em cultivares brasileiras de soja

Sabe-se que o processo de fixação biológica do N₂ resulta da interação de muitos genes, tanto da planta hospedeira como do microssimbionte, mas poucos estudos têm sido conduzidos sobre a genética da soja. Nesse contexto, mapas integrados da soja com marcadores do tipo microssatélites "simple sequence repeat" (SSR), conforme o descrito

¹ Bolsista de DTI do CNPq.

² Bolsista de IC do CNPq.

³ UFSC - Depto. de Fitotecnia, Florianópolis.

por Cregan et al. (Crop Science, v.39, p.1464-1490, 1999) oferecem uma oportunidade excelente para a identificação de caracteres relacionados à fixação biológica do N_2 (FBN). O objetivo foi identificar QTLs (quantitative trait loci) relacionados à nodulação e fixação do N_2 em uma população F_2 , composta de 160 plantas derivadas do cruzamento entre as cultivares Embrapa 20 e BRS 133, previamente identificadas como tendo bom potencial para o estudo de QTLs.

Material genético - Uma população de mapeamento F_2 de 160 indivíduos foi utilizada a partir de um cruzamento intraespecífico entre cultivares de soja com diferentes capacidades de FBN, Embrapa 20 e BRS 133. As plantas F_2 foram coletadas individualmente na maturidade para se obter as famílias $F_{2,3}$. As avaliações fenotípicas foram realizadas nas famílias F_3 para nodulação [número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e a relação (MNS/NN)] e crescimento das plantas (massa da parte aérea seca, MPAS).

Análise da capacidade de fixação biológica do N_2 - A segregação dos caracteres relacionados à fixação do N_2 das 160 famílias F_3 foi analisada em condições de casa de vegetação, em vasos contendo 4 kg de solo não estéril e areia. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições para cada família F_3 e 15 plantas de cada um dos parentais (Embrapa 20 e BRS 133) e as plantas foram inoculadas com as estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 566. Foram avaliados os parâmetros MPAS, NN, MNS de cada família F_3 , que foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas de acordo com o teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Ensaio com marcadores microsátélites (SSR, Simple Sequence Repeats)

- Para a busca desses marcadores foram coletadas de duas a três folhas das plantas das gerações parentais Embrapa 20 e BRS 133 e das plantas F_2 para a extração de DNA genômico. Um grupo de 252 marcadores foi escolhido, com base no mapa descrito por Cregan et al. (1999), com intervalos de, aproximadamente, 20 cM com cobertura nos 20 grupos de consenso da soja. Após as análises das amplificações PCR-SSR com o DNA dos indivíduos da população F_2 , foi testada a segregação codominante dos marcadores pelo teste de qui-quadrado ($P \leq 0,05$).

Análise dos dados e mapeamento de ligação - As médias dos caracteres de fixação do N_2 , a análise de regressão e as análises de variância foram realizadas usando o sistema de análise estatística, SAS. A ordem mais provável do mapa e as distâncias de ligação foram determinadas pela análise de múltiplo ponto, usando o programa MapMaker/Exp com LOD (likelihood of odds) de 3.0 e com uma distância máxima de Haldane de 50 cM. Cada combinação entre um caráter e um loco SSR foi submetida à análise de regressão para estabelecer a presença de um QTL ligado e estimar a variação fenotípica do caráter explicada através de efeitos aditivos do QTL detectado. A ligação entre um loco marcador e um caráter foi assumida quando houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre a comparação das edia genotípicas das classes de marcadores. A proporção da variância fenotípica explicada por cada QTL detectado foi estimada pelo coeficiente de determinação, R^2 . Também foi conduzida uma análise de variância com um fator (one-way-ANOVA) para todos os pares de combinações entre locos marcadores e caracteres quantitativos. Essa análise foi interpretada para indicar os desvios do loco marcador dos efeitos lineares e avaliar, assim, os efeitos de dominância. Além disso, interações entre QTLs (quantitative trait loci) não ligados foram examinadas usando a análise de variância com dois fatores (two-way-ANOVA), onde o fator de interação calculado representou uma ediative da interação entre os dois QTLs em determinar o fenótipo. QTLs também foram analisados através do mapeamento por intervalo com o programa MapMaker/QTL, considerando o LOD score de 2,0.

Polimorfismo de marcadores SSR nos genótipos parentais e mapeamento de ligação - Um total de 252 marcadores SSR cobrindo os 20 grupos de ligação da soja foram testados nas cultivares parentais Embrapa 20 e BRS 133 e apenas 89 foram polimórficos (Tabela 2.3). Entretanto, desses 89 marcadores polimórficos, somente 45 foram selecionados, os que apresentavam melhor separação de bandas no gel e, assim, maior resolução dos genótipos heterozigotos. Desvios da proporção esperada de 1:2:1 não foram detectados para os 45 locos marcadores. Desses 45 locos marcadores, somente 21 foram incluídos no mapa de ligação na população F_2 deste estudo, com uma distância máxima de

TABELA 2.3. Número de marcadores microssatélites SSR (simple sequence repeat) testados de cada grupo de consenso descrito por Cregan et al. (1999), número de SSR que detectaram polimorfismo nas cultivares parentais Embrapa 20 e BRS 133 e número de SSR testados nas plantas F₂.

Grupos de ligação ¹	Nº SSR testados	Nº SSR polimórficos	Nº SSR selecionados
MLG A1	11	5	1
MLG A2	19	5	3
MLG B1	11	6	5
MLG B2	11	4	4
MLG C1	12	3	2
MLG C2	17	2	1
MLG D1a+Q	11	4	1
MLG D1b+W	14	6	3
MLG D2	14	4	1
MLG E	11	2	0
MLG F	11	3	2
MLG G	16	5	1
MLG H	11	6	2
MLG I	12	5	3
MLG J	9	5	4
MLG K	12	5	3
MLG L	11	5	4
MLG M	14	5	3
MLG N	11	4	2
MLG O	14	5	0
Total	252	89	45

¹ Segundo Cregan et al. (1999).

Haldane de 50 cM. Nove grupos de ligação foram construídos, representando oito grupos de ligação já descritos na literatura (Fig. 2.4). A cobertura total do mapa foi de 251,2 cM, com uma média de 38,6 cM entre dois locos marcadores adjacentes e a ordem dos locos marcadores foi comparável com a do mapa de ligação integrado já descrito por Cregan et al. (1999).

Análise da FBN e a nodulação - Os resultados obtidos da análise de variância da geração $F_{2,3}$ são mostrados na Tabela 2.4. Diferenças significativas foram observadas entre as famílias F_3 para NN e MPAS, porém, não houve diferenças significativas para os parâmetros de MNS e a relação MNS/NN. Esse resultado é atribuído a que a variância F_3 dentro das famílias (QMD) foi superior à variância entre famílias (QME), indicando que os valores de D (efeito genético aditivo) e H (efeito genético de dominância) devem ser pequenos em relação à variância ambiental. O coeficiente de variação para MPAS foi de 21,9%, enquanto que, para os parâmetros de NN, MNS e MNS/NN, os valores dos coeficientes foram mais altos, de 53,2%, 57,5% e 53,7%, respectivamente. Entretanto, o coeficiente de variação para o parâmetro de nodulação é, freqüentemente, superior a 30%. Quanto ao desempenho dos parentais, Embrapa 20 teve maior média para MNS ($116,04 \pm 13,14$ mg planta⁻¹) e para a relação MNS/NN ($1,97 \pm 0,26$ mg nódulo⁻¹), enquanto que a média de BRS 133 para essas variáveis foi de $94,07$ mg planta⁻¹ (desvio padrão de $12,64$ mg planta⁻¹) e $1,25$ mg nódulo⁻¹ (desvio padrão de $0,12$ mg nódulo⁻¹), respectivamente, embora esses valores não tenham diferido estatisticamente. O comportamento das médias para as outras duas variáveis, MPAS e NN, foi diferente, mas para a MPAS foi semelhante em ambas as cultivares ($2,68$ g planta⁻¹ \pm $0,15$ para Embrapa 20 e $2,73$ g planta⁻¹ \pm $0,15$ para BRS 133) e, para

TABELA 2.4. Resumo da análise de variância para as variáveis massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e a relação MNS/NN em plantas F_3 de um cruzamento entre as cultivares Embrapa 20 e BRS 133.

Variável	Quadrado médio	Graus de liberdade	F	P	R ²	CV (%)
MPAS	0,54	1135	1,61	≤0,001	0,21	21,9
NN	1197,57	1135	1,23	≤0,05	0,17	53,2
MNS	2760,82	1135	0,98	0,54	0,14	57,5
MNS/NN	0,86	1135	1,05	0,32	0,14	53,7

o NN, a BRS 133 foi superior ($79,29 \pm 9,51$ nódulos planta⁻¹) à Embrapa 20 ($65,43 \pm 6,04$ nódulos planta⁻¹). A distribuição das frequências dos fenótipos das famílias F_3 mostrou segregação transgressiva, conforme foi relatado anteriormente em trabalhos anteriores conduzidos neste laboratório.

Marcadores associados a FBN e nodulação - Os resultados da análise de regressão com os locos marcadores como variáveis independentes e MPAS, NN, MNS e a relação MNS/NN como variáveis dependentes mostraram 13 associações significativas ($P \leq 0,05$) devido a efeitos aditivos; além disso, alguns locos marcadores foram significativamente associados com mais de um carácter (Tabela 2.5). A variação fenotípica (R^2) explicada por cada loco QTL loco marcador foi de 4% para MPAS e MNS/NN, 2% a 9% para NN e 3% a 6% para MNS (Tabela 2.5). O baixo nível da variação desses QTLs é consistente com a natureza quantitativa dos caracteres de FBN e nodulação na soja.

O mapeamento por intervalo revelou apenas duas regiões genômicas semelhante àquelas encontradas através da análise de regressão. Um intervalo foi incluído entre os marcadores Satt066 e Satt304, no grupo de ligação MLG B2, o qual teve efeito significativo ($P \leq 0,01$ e LOD 2,3) na expressão fenotípica no NN. O outro intervalo foi encontrado entre Satt197 e Satt509 no grupo de ligação LG B1 e foi significativamente associado ($P \leq 0,01$ e LOD 2,7) com MNS (Fig. 2.4). A contribuição para o NN e MNS desses QTLs putativos foi de 7,1% e 10%, respectivamente, semelhante aos valores obtidos pela análise de regressão. A discrepância no número de QTLs detectados entre ambos métodos pode ser explicada pelos diferentes níveis de significância adotados para a análise de regressão e o mapeamento de intervalo ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente). Outra explicação pode ser devido à precisão do método para detectar QTLs, uma vez que os resultados obtidos pela análise de regressão se aproximam aos obtidos pelo mapeamento de intervalos quando o QTL está localizado no loco marcador. Neste mapa de ligação, como as distâncias entre dois locos marcadores adjacentes foram superior a 20 cM (média de 38,6 cM), o mapa poderia ainda não estar suficientemente saturado para ser detectado pelo método de mapeamento por intervalo.

TABELA 2.5. Distribuição da ligação de marcadores mostrando associações significativas com diferenças significativas para MPAS (massa da parte aérea seca), NN (número de nódulos), massa da nódulos secos (MNS) e a relação MNS/NN por planta como determinado pela análise de regressão.

Grupo de ligação ⁽¹⁾	Marcador	Nível de significância do teste F		MPAS (mg.pl ⁻¹)		Nível de significância do teste F		R ²		NW		(nódulo.pl ⁻¹)	
		A ₁ A ₁ ⁽²⁾	A ₁ A ₂ ⁽²⁾	A ₁ A ₁ ⁽²⁾	A ₁ A ₂ ⁽²⁾	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂				
MLG B2	Satt066	-	-	-	-	0,0003	-	0,09	0,09	52,94b	57,82b	64,36a	-
MLG H/J	Satt192	-	-	-	-	0,05	-	0,02	0,02	55,64a	59,57a	60,90a	-
MLG B1	Satt197	≤0,02	0,04	2,56b ⁽³⁾	2,66ab	-	2,73a	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt_123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a.	Satt307	-	-	-	-	≤0,05	-	0,03	0,03	55,15b	59,06ab	61,14a	-
n.a.	Satt554	-	-	-	-	0,004	-	0,05	0,05	62,22a	58,77ab	53,81b	-

Continua...

...Continuação Tabela 2.5

Grupo de Ligação ⁽¹⁾	Marcador	Nível de significância do teste F		MNS (mg.pl ⁻¹)		R ²		Nível de significância do teste F		MNS/NW (mg.nódulo ⁻¹)	
		A ₁ A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁
MLG B2	Satt066	0,02	0,04	86,33b	91,83ab	97,47a	-	-	-	-	-
MLG H/J	Satt192	0,02	0,03	86,64b	93,61ab	95,78a	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt197	0,003	0,06	85,85b	92,31ab	101,0a	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt251	≤0,02	0,04	86,58b	91,71ab	97,48a	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt509	≤0,005	0,05	84,94b	91,90ab	97,99a	-	-	-	-	-
MLG B1	Sat_123	0,03	0,03	86,25b	92,64ab	96,79a	0,02	0,04	1,55b	1,72a	1,75a
n.a.	Satt307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a.	Satt554	≤0,02	0,04	97,67 ^a	91,03ab	86,82b	-	-	-	-	-

⁽¹⁾ Grupos de ligação como se mostra na Figura 1; n.a., não agrupado.

⁽²⁾ A₁ e A₂ – Alelos de locos marcadores em associação com alelos de locos QTL dos parentais Embrapa 20 e BRS 133, respectivamente.

⁽³⁾ Para cada caráter, valores seguidos pela mesma letra são diferentes significativamente de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$).

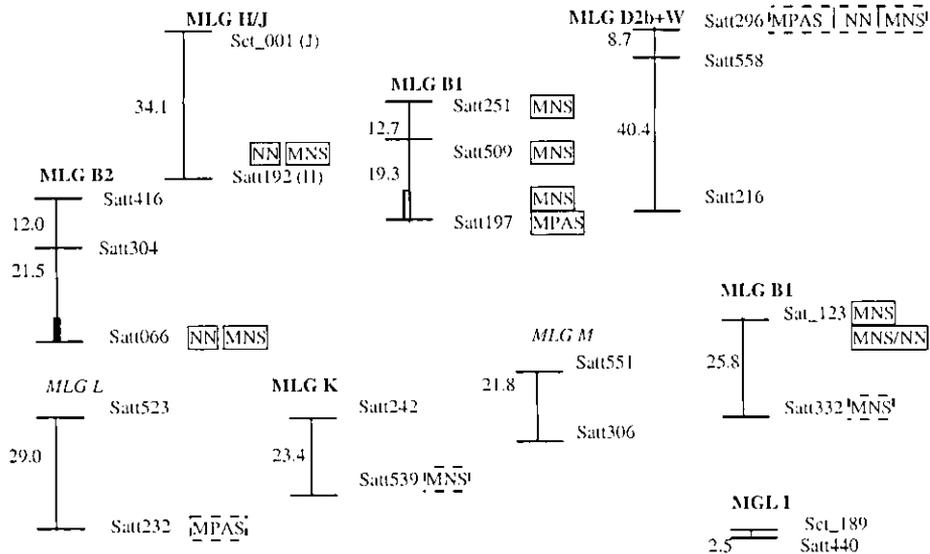


FIG. 2.4. Mapa de ligação da soja baseado na informação de 21 locos microssatélites (SSR) de uma população de mapeamento F_2 do cruzamento Embrapa 20 X BRS 133. Locos marcadores são mostrados à direita de cada grupo de ligação (MLG) e as distâncias genéticas (cM) são indicadas à esquerda como determinado pelo Mapmaker/Exp para LOD 3,0 e distância de Haldane de 50 cM. MPAS (massa da parte aérea seca), NN (número de nódulos), MNS (massa de nódulos secos) e relação MNS/NN denotam marcadores significativamente associados com os caracteres (quadros representam: efeitos aditivo e dominante, respectivamente). Quadros sobre os grupos de ligação: QTL para MNS (MLG B1: LOD 2.8) e QTL para NN (MLG B2: LOD 2.3), como determinado pelo Mapmaker/QTL.

Por outro lado, a análise de regressão mostrou que alelos da cultivar parental BRS 133 predominaram nas associações significativas, loco marcador - loco QTL, para aumentar o caráter em todas as variáveis testadas. Houve duas exceções, onde alelos de Embrapa 20 estiveram associados ao aumento do caráter para NN e MNS com o marcador Satt554 não agrupado no mapa de ligação (Tabela 2.5). Esse comportamento dos alelos dos parentais foi diferente do esperado dos resultados fenotípicos, pois sendo as médias para MNS e MNS/NN superiores em Embrapa 20, esperava-se que esse parental tivesse a maior propor-

ção dos alelos positivos associados aos caracteres. Entretanto, a presença de QTLs com efeitos alélicos opostos aos esperados dos fenótipos parentais está bem documentada e a presença desses QTLs “complementares” fornece uma explicação para a segregação transgressiva observada nas famílias F_3 desse cruzamento. Além disso, estes resultados sugerem uma estratégia para a seleção, mais eficiente, auxiliada por marcadores, com a combinação de alelos apropriados dos parentais para o melhoramento genético dos caracteres. Por exemplo, utilizando os alelos da Embrapa 20 para a transferência dos QTL associados ao marcador Satt554 para a MNS; ou bem, os alelos da BRS 133 na transferência dos QTLs ligados ao marcador Satt197 para MPAS.

A análise de variância com um fator (one-way-ANOVA) foi incluída como uma alternativa para detectar desvios do modelo linear aditivo devido a efeitos de dominância (Tabela 2.6). Nesta análise os dois graus de liberdade (g.l.) para os marcadores foram separados em um g.l para efeitos de dominância e um g.l para efeitos aditivos, sendo esses últimos equivalentes aos descritos na análise de regressão. Através da “one-way-ANOVA” foi possível detectar 13 associações significativas ($P \leq 0,05$) loco marcador - loco da característica quantitativa devido a efeitos de dominância (H). Efeitos de dominância têm sido freqüentemente detectados em estudos com mapeamento de QTLs. Neste trabalho, foram detectadas 26 associações significativas ($P \leq 0,05$) utilizando 17 marcadores microsatélites, sendo 13 relacionadas a efeitos aditivos (D) e 13 a efeitos de dominância (H) (Tabela 2.5). Esses resultados foram esperados, uma vez que parâmetros genéticos aditivos e de dominância já foram relatados em trabalhos prévios com um conjunto restrito de gerações F_3 , F_2 e os parentais Embrapa 20 e BRS 133.

Por outro lado, a análise de regressão e a análise de variância com um fator registraram ocorrência de QTLs controlando mais de um caráter. QTL com efeito aditivo foi associado com as variáveis MPAS e MNS no grupo de ligação MLG B1 no loco marcador Satt197 (Fig 2.4). Também, QTL com efeito de dominância para MPAS, NN e MNS foi associado no loco marcador Satt296 (MLG D1b+W) (Fig. 4). Outro QTL controlando dois caracteres, NN e MNS foi detectado em duas regiões

TABELA 2.6. Distribuição da ligação de marcadores mostrando efeitos genéticos aditivos (D) e efeitos genéticos de dominância (H) significativamente associados com MPAS (massa da parte aérea seca), NN (número de nódulos), massa da nódulos secos (MNS) e a relação MNS/NN por planta como determinado pela análise ANOVA com um fator.

Grupo de ligação ⁽¹⁾	Marcador	MPAS				NN			
		P ⁽²⁾	R ²	P		R ²	D	P	
				D ⁽³⁾	H ⁽⁴⁾			D	H
MLG B2	Satt066	-	-	-	-	0,001	0,09	0,003	0,70
MLG H/J	Satt192	-	-	-	-	0,13	0,03	0,05	0,54
MLG B1	Satt197	0,05	0,04	0,02	0,72	-	-	-	-
MLG B1	Satt251	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt509	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG D1b + W	Satt296	0,03	0,04	0,38	0,01	0,02	0,05	0,97	0,007
MLG L	Satt232	0,05	0,04	0,27	0,03	-	-	-	-
MLG K	Satt539	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Satt332	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG B1	Sat_123	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a	Satt233	-	-	-	-	0,03	0,04	0,92	0,008
n.a	Satt303	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a	Satt307	-	-	-	-	0,12	0,03	0,05	0,67
n.a	Satt339	0,07	0,03	0,25	0,04	-	-	-	-
n.a	Satt373	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a	Satt414	-	-	-	-	0,07	0,03	0,42	0,03
n.a	Satt554	-	-	-	-	0,02	0,05	0,004	0,73

Continua...

Grupo de ligação ⁽¹⁾	Marcador	MNS				MNS/NN			
		P	R ²	P		P	R ²	P	
				D	H			D	H
MLG B2	Satt066	0,07	0,04	0,02	0,98	-	-	-	-
MLG H/J	Satt192	0,05	0,04	0,02	0,44	-	-	-	-
MLG B1	Satt197	0,01	0,06	0,003	0,73	-	-	-	-
MLG B1	Satt251	0,05	0,04	0,02	0,91	-	-	-	-
MLG B1	Satt509	0,02	0,05	0,005	0,89	-	-	-	-
MLG D1b + W	Satt296	0,09	0,03	0,96	0,03	-	-	-	-
MLG L	Satt232	-	-	-	-	-	-	-	-
MLG K	Satt539	0,07	0,04	0,55	0,02	-	-	-	-
MLG B1	Satt332	0,05	0,04	0,35	0,02	-	-	-	-
MLG B1	Sat_123	0,09	0,03	0,03	0,74	0,09	0,04	0,03	0,74
n.a.	Satt233	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a.	Satt303	0,02	0,05	0,65	0,005	0,02	0,05	0,48	0,007
n.a.	Satt307	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a.	Satt339	-	-	-	-	-	-	-	-
n.a.	Satt373	0,03	0,05	0,37	0,01	-	-	-	-
n.a.	Satt414	-	-	-	-	0,02	0,05	0,18	0,02
n.a.	Satt554	0,05	0,04	0,01	0,71	-	-	-	-

...Continuação Tabela 2.6

⁽¹⁾ Grupos de Ligação como mostrado na Figura 1; n.a., não agrupado com grupo de ligação.

⁽²⁾ Nível de Significância do teste *F* na one-way-ANOVA em conjunto com 2 graus de liberdade.

⁽³⁾ Graus de liberdade devido a efeitos aditivos (D), valores são equivalentes à análise de regressão.

⁽⁴⁾ Graus de liberdade devido a efeitos de dominância (H). *P*: nível de significância de teste *F*.

genômicas, no LG B2 associado a Satt066 e MLG H/J associado a Satt192 e associado ao loco não agrupado Satt554 (Tabela 2.6). As correlações observadas podem ser devido a QTLs estreitamente ligados ou a um único QTL, com efeito pleitrópico.

Interação entre QTL não ligados - Uma análise de variância com dois fatores foi realizada entre todas as possíveis combinações de locos marcadores não ligados para localizar interações entre QTLs específicos ou interação entre genótipos por genótipos. Nessa análise, um loco marcador associado significativamente com um QTL (loco A, associado significativamente $P \leq 0,05$ pela análise de regressão) e um outro loco marcador não ligado (loco B, significativo a $P \leq 0,05$, ou não significativo $P \geq 0,05$ pela análise de regressão) foram usados como variáveis independentes e as características quantitativas como variáveis dependentes. Nessa análise, o fator de interação calculado foi utilizado como estimativa da interação entre dois QTLs, na expressão do fenótipo. Assim, a significância de um fator de interação sugere que o efeito resultante pelos dois QTLs juntos não é apenas a soma de seus efeitos independentes. Seis interações entre pares de locos marcadores foram significativas para $P \leq 0,05$ (Tabela 2.7 e Fig. 2.5). Para MPAS, duas interações foram encontradas (loco A, significativo a $P \leq 0,05$ e loco B, não significativo a $P \geq 0,05$). Uma dessas interações, entre os locos marcadores Satt197 e Satt233, teve um R^2 explicando 12% da variação fenotípica e os alelos nos locos QTLs que estão aumentando o caráter vêm de BRS 133 ($A_2A_2B_2B_2$), os quais superaram a média em 8% (Tabela 2.7). A segunda interação para MPAS foi entre os locos Satt197 e Satt317, com um R^2 de 11%. Os alelos nos locos QTLs que aumentaram a média do caráter em até 8,3% tiveram uma combinação mista, com alelos de BRS 133 no loco Satt197 e de alelos de Embrapa 20 no loco Satt317 ($A_2A_2B_1B_1$) (Tabela 2.7). Para NN, apenas uma interação foi significativa (loco A significativo $P \leq 0,05$ e loco B, não significativo $P \geq 0,05$), entre os locos marcadores Satt192 e Satt197 e a variação fenotípica explicada por essa interação atingiu 12% (R^2). Essa interação teve o maior efeito entre todas as interações detectadas, já que a combinação entre os alelos de BRS 133 no loco Satt192 (A_2A_2) e de Embrapa 20 no loco Satt197 (B_1B_1) superaram a média de

TABELA 2.7. Descrição de interações genótipo por genótipo entre dois locos marcadores SSR não ligados associados com diferenças fenotípicas para MPAS (massa da parte aérea seca), NN (número de nódulos), massa de nódulos seca (NDW) e a relação MNS/NN como determinado pela análise ANOVA com dois fatores.

Variável	Loco A ⁽¹⁾		Loco B ⁽¹⁾		Pares de Locos		Média	P	R ² (2)	A ₁ A ₁ B ₁ B ₁ ⁽³⁾	A ₁ A ₁ B ₂ B ₂	A ₂ A ₂ B ₁ B ₁	A ₂ A ₂ B ₂ B ₂
	P	R ²	P	R ²	Loco A	Loco B							
MPAS (mg.pl ⁻¹)	0,02	0,04	0,68	0,005	Satt197 x Satt233	Satt197 x Satt317	2,65	0,03	0,12	2,74	2,47	2,78	2,86
	0,02	0,04	0,07	0,03	Satt197 x Satt317		2,65	0,05	0,11	2,45	2,68	2,87	2,58
NN (no.pl ⁻¹)	0,05	0,02	0,17	0,02	Satt192 x Satt197		59,06	0,01	0,12	58,09	57,86	75,54	59,28
	0,01	0,06	0,05	0,04	Satt197 x Satt192		93,06	0,02	0,15	86,04	113,18	98,93	93,91
MNS (mg.pl ⁻¹)	0,05	0,04	0,04	0,04	Satt251 x Satt554		91,81	0,008	0,15	87,56	77,42	100,47	82,35
	0,02	0,05	0,04	0,04	Satt509 x Satt554		91,81	0,05	0,14	84,91	79,04	103,64	77,54

⁽¹⁾ valores determinados pela análise de regressão

⁽²⁾ coeficiente de determinação como resultado do modelo com ambos fatores mais a interação entre eles: loco A+ loco B + (A x B)

⁽³⁾ A₁, B₁ e A₂, B₂ denotam alelos dos locos marcadores em associação com alelos 1 e 2 do loco GTL dos parentais Embrapa 20 e BRS 133, respectivamente.

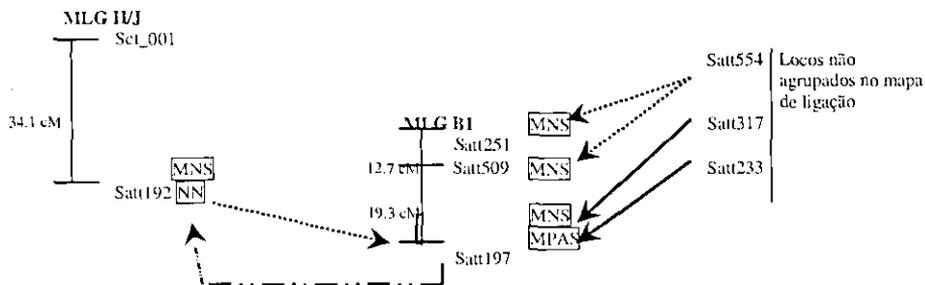


FIG. 2.5. Interações entre pares de locos não ligados. MPAS (massa da parte aérea seca), NN (número de nódulos) e MNS (massa de nódulos secos) denotam marcadores mostrando associação significativa com esses caracteres. Interação para MPAS (\longrightarrow), NN ($- \cdot \longrightarrow$) e MNS ($\cdots \longrightarrow$).

nódulos em até 28% (Tabela 2.7). Três outras interações foram detectadas entre pares de locos marcadores significativamente associados a QTLs controlando o parâmetro de MNS. Duas contribuíram com 15% (R^2) da variação fenotípica, uma entre os locos Satt197 e Satt192 e a outra entre Satt251 e Satt554. A melhor combinação de alelos parentais incrementando a média de MNS em 22% foi verificada entre os alelos da Embrapa 20 no loco Satt197 e alelos da BRS 133 no loco Satt192 ($A_1A_1B_2B_2$). A terceira interação para MNS foi verificada entre os locos marcadores Satt509 e Satt554, com um valor de R^2 de 14%.

Outras deduções podem ser feitas a partir das interações entre QTLs não ligados mostradas neste trabalho, as quais poderiam ajudar a explicar a ocorrência de QTLs controlando mais de um caráter. Foi constatado um QTL associado significativamente com a MPAS ($P \leq 0,02$, Tabela 2.5) e MNS ($P \leq 0,003$ Tabela 2.5) no loco marcador Satt197, no grupo de ligação MLG B1 (Fig. 2.4). Além disso, ocorreram interações entre esse loco marcador e os locos Satt233 e Satt317 que afetaram a MPAS, mas a MNS (Tabela 2.7 e Fig. 2.5). A falta de um efeito significativo dos locos Satt233 e Satt317 sobre a MNS sugere que um gene separado poderia existir controlando a MPAS. Argumento semelhante pode ser usado para o QTL ligado ao marcador Satt192 associado significativamente com NN ($P \leq 0,05$, Tabela 2.6) e MNS ($P \leq 0,02$, Ta-

bela 2.7). Existem interações entre Satt192 e Satt197 que estão afetando tanto o NN como a MNS (Tabela 2.7 e Fig. 2.5). Essas interações poderiam indicar que há um único QTL controlando ambos os caracteres. Entretanto, nesta etapa do trabalho não é possível concluir se o Satt192 está associado a um único QTL com efeito pleiotrópico sobre NN e MNS, ou se o Satt197 está ligado a dois QTL separados e diferentes controlando MPAS e MNS. Para isso, serão necessárias mais análises genéticas detalhadas para se obter um mapa com maior saturação nessa região genômica.

A variação fenotípica para os caracteres quantitativos determinada pela análise de regressão (4% para MPAS e MNS/NN, 2% to 9% para NN e 3% to 6% para MNS, Tabela 2.6) e pela análise de variância com dois fatores (11% a 12% para MPAS, 12% para NN e 14% a 15% para MNS) através dos marcadores SSR pode ser relacionada com as estimativas da herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) previamente relatada para as famílias F_3 derivadas do mesmo cruzamento por este grupo de pesquisa. Essas estimativas de (h_a^2) foram de 13% para NN, 26% para MNS e 20% para a ralação MNS/NN, e o valor maior relatado foi para MPAS (61%). Através desses resultados é possível observar que a análise de regressão explica parcialmente a variação genética para os caracteres nesta população. Assim, as interações entre QTLs não ligados detectados neste estudo deveriam computar uma quantidade adicional da variação para os caracteres quantitativos. Por outro lado, a variação que ainda não pode ser explicada neste trabalho, particularmente para MPAS, pode ser atribuída à variância ambiental ou a associações significativas entre outros locos marcadores não detectados neste estudo.

No presente estudo, foi possível identificar vários locos marcadores com associações significativas com os parâmetros de MPAS, NN e MNS, incluindo efeitos aditivos e de dominância na soja. Também foi possível associar a informação molecular com os parâmetros genéticos ([d] e/ou D, [h] e/ou H) dos estudos de herança previamente determinados para essa população. Estudos adicionais para testar os QTLs identificados em outras populações de mapeamento (Bossier X Embrapa

20) assim como também o uso de outros marcadores SSR para obter um mapa com maior saturação em linhas $F_{7,8}$ do cruzamento entre Embrapa 20 e BRS 133, estão em curso. A principal intenção é a inclusão desses marcadores SSR nos programas de melhoramento genético para melhorar a contribuição do processo de fixação biológica do nitrogênio nas novas cultivares de soja.

2.3 Microrganismos associativos promotores do crescimento de soja (04.2001.338-03)

Alexandre José Cattelan; Anízia Fátima Ferreira Betti; José Zucca Moraes; Rubson Natal Sibaldelli; Miguel Pereira de Souza; Lara Munique Ferracin¹

O custo com insumos e o impacto de estresses abióticos podem ser diminuídos através da melhor exploração dos nutrientes e da água do solo pelas plantas, assim como através de um crescimento mais rápido. Isso pode ser parcialmente alcançado através da inoculação com microrganismos promotores do crescimento de plantas, especialmente bactérias. Geralmente, o crescimento vegetal é aumentado porque esses microrganismos protegem as plantas contra microrganismos patogênicos ou deletérios, solubilizam nutrientes do solo, produzem hormônios vegetais ou apresentam efeito sinérgico com a fixação simbiótica do nitrogênio, no caso das leguminosas.

Este subprojeto visa obter isolados de rizobactérias (bactérias rizosféricas) promotoras do crescimento da soja (RPCS), que sejam benéficos à cultura da soja em pelo menos um dos seguintes aspectos: melhor utilização dos nutrientes e da água do solo, maior eficiência da fixação simbiótica do N_2 , proteção contra microrganismos fitopatogênicos, crescimento mais rápido e maior rendimento de grãos. Em 2001/02 foram obtidos 20 isolados de bactérias relacionadas à promo-

¹ Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL).

ção do crescimento da soja e, além desses, outros isolados promissores estão sendo avaliados quanto a suas características *in vivo* e *in vitro*. Em 2001/02, foram conduzidos experimentos em casa de vegetação e a campo com os isolados que apresentaram maior potencial nos testes *in vitro*.

Teste de solubilização de fosfato em casa de vegetação - O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Amarelo com baixo teor de P, proveniente de Ponta Grossa, PR. O solo de todos os tratamentos foi corrigido (3,1 t de CaCO_3 ha^{-1}) e adubado com K, na forma de KCl, e com micronutrientes (70 kg K_2O ha^{-1} e 30 kg de FTE Mamboré Ponta Grossa ha^{-1} , respectivamente). O solo de todos os tratamentos, com exceção da testemunha positiva, recebeu fosfato de Argélia, na dose equivalente a 80 kg de P_2O_5 ha^{-1} . Cada vaso plástico recebeu 3 kg de solo. Os tratamentos foram os seguintes: testemunha positiva (recebeu adubação com superfosfato triplo em dose correspondente a 100 kg P_2O_5 ha^{-1}), testemunha negativa (sem adição de fosfato solúvel), isolados de bactérias GN1201, GN2214, LN3212, AB 202, P 06, P 07, P 08, P 10, P 21, P 23, P 45 e P 53.

As bactérias foram cultivadas em 1/10 TSA, a 28°C, colhidas, suspensas em 0,1 M MgSO_4 (pH 7,0) e a densidade óptica foi ajustada para uma absorbância de 0,55 a 600 nm. Sementes de soja cv. BRS 156 foram inoculadas com cada um dos isolados e semeadas em número de seis por vaso. Foram usadas cinco repetições. Os tratamentos testemunha não foram inoculados.

Após a emergência, as plântulas foram desbastadas para duas por vaso. As plantas foram colhidas aos 52 dias após semeadura, avaliando-se a massa e o comprimento das raízes, a massa dos nódulos e da parte aérea e o teor de nitrogênio e fósforo no tecido.

Com exceção do comprimento de raízes, nenhum outro parâmetro avaliado foi aumentado pela inoculação com as bactérias solubilizadoras (Tabela 2.8). O isolado GN 2214 aumentou em 60% o comprimento das raízes em relação à testemunha negativa e em 54% em relação à testemunha positiva. Nenhum isolado aumentou a absorção de P pelas plantas.

TABELA 2.8. Desenvolvimento vegetativo, nodulação e teor de nitrogênio e fósforo no tecido de plantas de soja cv. BRS 156 inoculadas com bactérias rizosféricas solubilizadoras de fosfato em casa de vegetação, Londrina, PR, 2002.

Tratamento	Massa seca raízes		Comprimento raízes (cm 2pl ⁻¹)	Massa seca nódulos (mg 2pl ⁻¹)	Massa seca p. aérea (mg 2pl ⁻¹)	Nitrogênio na p. aérea (g kg ⁻¹)	Fósforo na p. aérea (g kg ⁻¹)
	(mg 2pl ⁻¹)	(mg 2pl ⁻¹)					
Testem. positiva	949	8	160	2.169	42,0	2,3	
Testem. negativa	947	4	154	1.921	42,9	1,8	
P 06	796	2	136	1.495	40,4	1,3	
P 07	792	4	131	1.754	40,7	1,4	
P 08	799	2	122	1.748	40,3	1,6	
P 10	809	1	159	1.563	40,2	1,3	
P 21	854	3	132	1.637	42,3	1,4	
P 23	757	4	106	1.544	41,2	1,3	
P 45	804	2	123	1.460	40,0	1,3	
P 53	927	3	179	1.938	41,8	1,3	
AB 202	816	2	141	1.733	40,5	1,6	
GN 2214	794	2	247	1.611	39,5	1,3	
LN 3212	813	4	137	1.788	39,0	1,6	
GN 1201	753	2	149	1.452	38,5	1,3	

Testes a Campo - Seis isolados de bactérias (GN 1201, GN 2214, LN3212, AB 202, P 21 e P 53), escolhidos em função dos testes *in vitro* e em casa de vegetação, foram testados a campo em Londrina e Ponta Grossa, PR. Foram preparados inoculantes à base de turfa para cada isolado.

Três ensaios foram instalados em dois locais no Estado do Paraná: um na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, em um Latossolo Roxo, e outros dois, na estação experimental da Embrapa Transferência de Tecnologias, em Ponta Grossa, em um Latossolo Vermelho-Escuro, sendo uma área com adubação fosfatada normal e outra com baixo fósforo, na safra 2001/02. Nos três experimentos, foram feitas adubações com KCl, na dose equivalente a 50 kg de $K_2O\ ha^{-1}$. No experimento em Londrina e no experimento em Ponta Grossa, com nível normal de fósforo, foi aplicado superfosfato triplo na dose equivalente à 60 kg de $P_2O_5\ ha^{-1}$. O experimento com baixo fósforo foi adubado com fosfato de rocha de Argélia, na dose equivalente a 80 kg de $P_2O_5\ ha^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com cinco repetições e parcelas de 4,0 por 6,0 m.

Sementes de soja cv. BRS 156 foram inoculadas com 500 g de inoculante turfoso dos isolados testados por 50 kg de semente e com a mesma dose de inoculante turfoso com as estirpes SEMIA 587 (*B. elkanii*) + SEMIA 5080 (*B. japonicum*), produzidos pela FEPAGRO. A testemunha foi inoculada apenas com *Bradyrhizobium* spp. Aos 35 dias após a emergência, 10 plantas por parcela foram medidas quanto à altura; aos 56 dias após a semeadura, 10 plantas por parcela foram coletadas com o sistema radicular intacto para avaliação da nodulação, desenvolvimento das raízes e da parte aérea e, quando as plantas estavam em maturação fisiológica, avaliaram-se o rendimento de grãos (corrigido para 13% de umidade) e a massa de 100 grãos.

Embora todos esses parâmetros avaliados tenham sido aumentados por pelo menos um dos isolados testados, apenas para o desenvolvimento radicular os aumentos foram estatisticamente significativos (Tabela 2.9). Os isolados GN 1201, GN 2214, LN 3212 e AB 202 aumentaram significativamente a massa das raízes em relação ao tratamento

TABELA 2.9. Desenvolvimento vegetativo, nodulação e rendimento de grãos de plantas de soja cv. BRS 156 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Londrina, PR. Safra 2001/02.

Tratamento	Altura de plantas (cm)	Número de nódulos (no pl ⁻¹)	Massa seca		Massa seca P. aérea (mg pl ⁻¹)	Rendim. de grãos (kg ha ⁻¹)	Massa de 100 grãos (g)
			raízes (mg pl ⁻¹)				
Testemunha	18,1 ^{NS1}	14,0 ^{NS}	293b		1.267 ^{NS}	3.219 ^{NS}	10,4 ^{NS}
GN1201	18,4	15,6	401a		1.610	2.942	9,9
GN2214	18,1	15,7	430a		1.685	3.053	10,1
P21	18,8	17,5	348ab		1.540	3.240	10,2
P53	17,5	16,9	353ab		1.538	3.135	10,0
LN3212	17,7	17,7	390a		1.582	3.367	10,7
AB202	17,6	16,9	411a		1.775	3.268	10,1

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, ao nível de 5%.

não inoculado (testemunha). O rendimento de grãos não foi afetado significativamente ao nível de significância de 5% mas, ao nível de 7%, o isolado LN 3212 aumentou significativamente o rendimento de grãos em relação à testemunha (148 kg ha⁻¹). Os dois experimentos conduzidos em Ponta Grossa foram perdidos por severa seca ocorrida.

3

USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA MAXIMIZAR A CONTRIBUIÇÃO DOS RIZÓBIOS FIXADORES DE NITROGÊNIO E DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS À INOCULAÇÃO

Nº do Projeto: 02.2001.327 **Líder:** Mariangela Hungria

Nº de subprojetos que compõem o projeto: 04

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja, FEPAGRO, IAPAR

Diversas bactérias diazotróficas conseguem se associar simbioticamente a algumas leguminosas, estabelecendo o processo de fixação biológica do N_2 e suprimindo as necessidades de nitrogênio (N) das plantas. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), por sua vez, se associam às raízes de diversas espécies de plantas, resultando em aumento na absorção de nutrientes e reduzindo a suscetibilidade a doenças e estresses hídricos. Para garantir a maximização da contribuição da fixação de N_2 e a contribuição dos FMA, porém, diversas linhas de pesquisa precisam ser conduzidas e, para isso, é importante utilizar metodologias para a identificação das estirpes/isolados, permitindo monitorar a diversidade das populações e determinar as respostas à inoculação. Nesse contexto, este projeto, composto por quatro subprojetos, desenvolve trabalhos relacionados ao uso de marcadores moleculares, visando a maximização da contribuição dos processos biológicos. No primeiro subprojeto, de "Caracterização molecular da coleção de referência nacional para rizóbio (SEMIA)" (02.2001.327.01) (coordenado pela M.Sc. Eliane Villamil Bangei, da FEPAGRO), estão sendo caracterizadas geneticamente estirpes de rizóbios recomendadas para o uso em inoculantes para leguminosas de clima temperado, leguminosas forrageiras de clima tropical e leguminosas para adubação verde. No segundo subprojeto (02.2001.327.02) "Caracterização da diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro em solos brasileiros e seleção de estirpes mais eficientes e competitivas" (coordenado pela Dra. Mariangela Hungria, Embrapa Soja), estão sendo caracterizadas estirpes de rizóbio capa-

zes de nodular o feijoeiro, bem como estão sendo conduzidos ensaios de inoculação com estirpes superiores de rizóbio para essa leguminosa. No quarto subprojeto (04.2001.04) "Uso de marcadores moleculares na determinação da diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em sistemas de cultivo plantio direto e convencional, rotações de culturas e coberturas verdes" (coordenado pelo Dr. Arnaldo Colozzi-Filho, do IAPAR), estão sendo conduzidos estudos sobre o uso de marcadores moleculares com fungos micorrízicos arbusculares. No subprojeto 3, estão sendo conduzidos estudos sobre a diversidade microbiana e de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em solos cultivados com feijoeiro e soja sob os sistemas de semeadura direta (SD) ou convencional (SC). Constatou-se que a SD resultou em maior biomassa e atividade microbiana, quando comparada aos solos submetidos ao preparo com arado. Além disso, a presença de uma leguminosa estimulou a atividade microbiana, acelerando o processo de decomposição dos resíduos vegetais. No Estado de Mato Grosso, foram isoladas estirpes a partir de nódulos coletados em seis propriedades, tendo-se constatado maior diversidade genética em solos sob SD, quando comparados aos sob SC. Todas as áreas do MT possuíam população estabelecida de *Bradyrhizobium*, contudo, a reinoculação contínua desempenhou um papel importante no aumento da diversidade genética. A seguir, serão relatados os resultados obtidos, nesse subprojeto, com a cultura da soja, em 2002.

3.1 Diversidade microbiana e de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em solos cultivados com feijoeiro e soja sob os sistemas de plantio direto e plantio convencional (02.2001.327-03)

Julio Cezar Franchini; Rosinei Aparecida de Souza¹; Mariangela Hungria; Eleno Torres; Rubens José Campo

3.1.1 Comportamento funcional do N na biomassa microbiana em diferentes sistemas de preparo do solo

¹ Bolsista de IC do CNPq.

Devido à importância do N na nutrição mineral das plantas e à diversidade de processos que conduzem a perdas desse nutriente nos sistemas agrícolas, o N na forma orgânica está diretamente relacionado à sustentabilidade dos sistemas agrícolas brasileiros, em geral pobres nesse nutriente. Conseqüentemente, o incremento do N da biomassa microbiana desempenha um papel crucial na ciclagem de N e na manutenção da fertilidade do solo. Entre os vários sistemas de preparo do solo, existem indicações de que o sistema de semeadura direta (SD), mais conhecido como plantio direto, contribui para o aumento da biomassa microbiana do solo, tanto em relação ao C, quanto ao N, contudo, vários estudos ainda precisam ser conduzidos para estabelecer, com melhor precisão, a contribuição da biomassa microbiana para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Com o objetivo de avaliar a influência do preparo do solo sobre a dinâmica do N na biomassa microbiana (NMB) foi amostrada, periodicamente, de 09/2001 a 02/2002, a camada de 0 a 10 cm dos tratamentos em que a semeadura da soja foi realizada sob os sistemas de semeadura direta (Di), escarificação com arado cruzador (Cr) e semeadura convencional com arado de disco (Ad), em um experimento conduzido há 13 anos sob esses manejos, em Latossolo Vermelho distroférico, na Estação Experimental da Embrapa Soja, Londrina, PR. O preparo do solo ocorreu aos 30 dias após a primeira avaliação e a semeadura aos 40 dias. O NMB foi avaliado pelo método de fumação e extração, antes (NMBI, valor inicial) e após (NMBF, valor final) a incubação das amostras em condições otimizadas, no laboratório, por 10 dias, a 25°C.

O NMB foi maior no Di em relação ao Ad, tanto antes, quanto depois do período de incubação no laboratório, confirmando que os 13 anos de adoção do sistema Di favoreceram o incremento do N da biomassa microbiana (Figs. 3.1A e 3.01B). O uso do escarificador para o preparo do solo proporcionou valores intermediários entre o Di e o Ad. Conseqüentemente, os resultados obtidos neste ensaio, em que os três sistemas de preparo do solo estavam estabelecidos por um período de tempo considerável, fornecem uma forte evidência de que o NMB pode ser

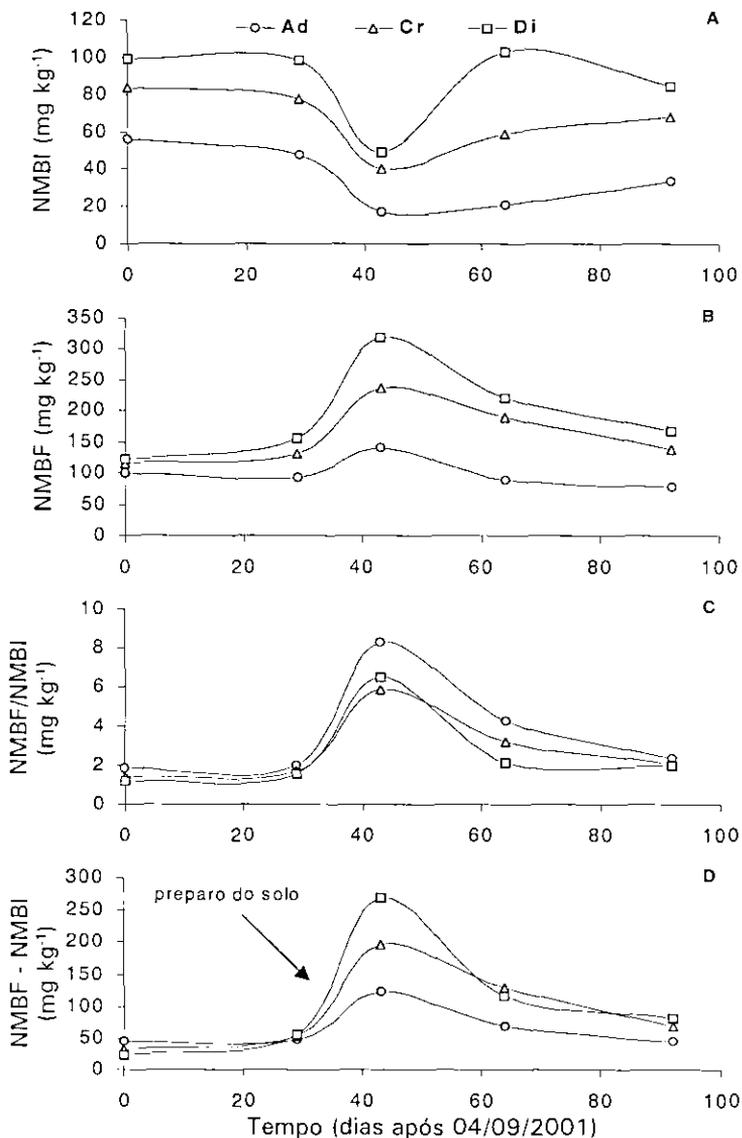


FIG. 3.1. Nitrogênio na biomassa microbiana (NMB) antes (I) e após (F) a incubação das amostras, relação NMBF/NMBI e taxa líquida de NMB (NMBF-NMBI) em diferentes sistemas de preparo de solo (Ad: arado de discos; Cr: escarificação com arado cruzador; Di: semeadura direta), em Latossolo Vermelho distroférrico de Londrina, PR.

utilizado como um bioindicador da sustentabilidade dos agroecossistemas. O NMBI resulta da avaliação nas condições próximas àsquelas do campo, enquanto o NMBF resulta da incubação sob condições ambientais otimizadas. A relação NMBF/NMBI foi superior no sistema o Ad, em relação ao Di, indicando, portanto, maior limitação na atividade da microbiota, a campo, no Ad (Fig. 3.1C), provavelmente relacionada a diversos fatores adversos, como temperaturas mais elevadas e menores teores de umidade e de C nesse sistema, em relação ao Di. Por outro lado, a imobilização líquida (NMBF-NMBI) no Di foi praticamente o dobro da observada no Ad, em todas as avaliações realizadas (Fig. 3.1D). Em pouco mais de uma década de estabelecimento do Di, portanto, foi possível obter incrementos na biomassa microbiana de N, em relação ao Ad, consideravelmente superiores aos relatados em trabalhos conduzidos em outros países, indicando taxas mais elevadas de ciclagem de nutrientes nas condições deste experimento.

3.1.2 Perdas de NH_3 e CO_2 durante a decomposição de treçoço utilizado como adubo verde em semeadura direta

Na Região Sul, mais de 80% da área agrícola tem sido cultivada em sistema de semeadura direta. Associada à SD, a rotação de culturas é uma prática importante de manejo agrícola que tem proporcionado melhorias nas condições químicas, físicas e biológicas do solo, resultando em incrementos no rendimento das culturas comerciais. A inserção de plantas leguminosas de adubação verde com alto potencial de fixação biológica de N_2 no sistema de rotação pode substituir, total ou parcialmente, a adubação nitrogenada recomendada para culturas de grãos de não-leguminosas, bem como contribuir para o aumento do N e do C no solo. Este aumento no nível de matéria orgânica do solo contribui para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e, também, resulta na redução das emissões e aumento da fixação de CO_2 , uma das grandes preocupações ambientais da atualidade. Por outro lado, a manutenção dos resíduos na superfície do solo pode favorecer as perdas de N na forma de NH_3 . Nesse contexto, foram avaliadas as perdas de CO_2 e NH_3 no sistema de SD durante a decomposição de quantidades cres-

centes de palha de tremoço (*Lupinus angustifolium*), umas das plantas de cobertura e adubação verde mais utilizadas nos sistemas de rotação de culturas na Região Sul.

O experimento foi conduzido num Latossolo Vermelho distroférico típico, textura muito argilosa, na área da fazenda experimental de Embrapa Soja, em Londrina, PR. A área experimental vem sendo conduzida sob o sistema de SD nos últimos 11 anos e, nos últimos dois anos, com a cultura da soja (*Glycine max*) no verão e pousio no inverno. O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. Foram estabelecidas parcelas de 60 m², nas quais foram aplicados os tratamentos especificados na Tabela 3.1. As parcelas com o tratamento "raízes" foram cultivadas com tremoço e tiveram a parte aérea retirada da parcela. No tratamento "raízes + 175", o procedimento realizado no tratamento "raízes" foi repetido, entretanto, foram adicionados 175 kg ha⁻¹ de N na forma de tremoço. Os demais tratamentos receberam resíduos de tremoço produzidos em área adjacente

TABELA 3.1. Identificação dos tratamentos e quantidades equivalentes de massa da parte aérea seca de tremoço, C e N aplicados.

Tratamentos	Nome	Massa da parte aérea seca (kg ha ⁻¹)	C (kg ha ⁻¹)
Vegetação espontânea	Pousio	0	0
Tremoço raízes	Raiz	0	0
Tremoço raízes + 175 kg N ha ⁻¹ tremoço	Raiz + 175	5.833	2.683
30 kg N ha ⁻¹ tremoço	30	1.000	460
60 kg N ha ⁻¹ tremoço	60	2.000	920
120 kg N ha ⁻¹ tremoço	120	4.000	1.840
175 kg N ha ⁻¹ tremoço	175	5.833	2.683
300 kg N ha ⁻¹ tremoço	300	10.000	4.600

N = 2,86 g kg⁻¹; C = 46 g kg⁻¹

ao experimento. Os resíduos foram cortados e aplicados quando o tremço estava no estágio de grão leitoso. Após o estabelecimento dos tratamentos foram instalados coletores para a captura de NH_3 e CO_2 . Os coletores para captura de NH_3 eram abertos e constituídos por uma garrafa do tipo "PET" (polyethylene terephthalate), com o fundo cortado. No interior havia uma estrutura para suporte de uma fita de papel de filtro mergulhada em 25 ml de H_2SO_4 0,1M. Cada parcela recebeu um conjunto com três coletores. As fitas eram recolhidas junto com a solução e substituídas a intervalos de 2 a 4 dias. O N-NH_3 foi quantificado como NH_4^+ por colorimetria com indofenol. A eficiência dos coletores foi ajustada pela avaliação das perdas em soluções padrões tratadas com Ca(OH)_2 em pastilhas. Os coletores para captura de CO_2 eram constituídos de tubos de "PVC" com 20 cm de altura e 10 cm de diâmetro. Três tubos por parcela foram enterrados até 5 cm de profundidade, com os resíduos incluídos em seu interior. No interior foi colocado um recipiente com 20 ml de NaOH 0,5 M e o coletor foi fechado com a respectiva tampa. Os recipientes com NaOH foram substituídos a intervalos de 2 a 4 dias. O CO_2 evoluído foi quantificado indiretamente pela titulação do NaOH não consumido. Uma área adjacente não cultivada e mantida sem vegetação foi avaliada como controle da emissão de CO_2 resultante da mineralização da matéria orgânica nativa do solo.

A taxa de emissão de CO_2 nos primeiros 27 dias após a aplicação dos resíduos de tremço foi proporcional à quantidade de material aplicado (Fig. 3.2). Nesse período, os tratamentos "300", "raiz + 175", "175" e "raiz" foram os que apresentaram os maiores valores de CO_2 emitido, com valores médios de $12 \text{ kg C-CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Comparando-se os tratamentos "300" e "175 + raiz", observa-se uma participação importante das raízes de tremço na emissão de CO_2 . O regime de chuvas durante o período experimental teve grande influência sobre os resultados observados. Durante o período compreendido entre 15 e 45 dias, a precipitação pluviométrica foi pequena (Fig. 3.3), o que resultou em taxas baixas de evolução de CO_2 , não tendo ultrapassado 10% do C aplicado, bem como em pequenas diferenças entre os tratamentos. A partir do 40º dia, as chuvas ocorreram com maior periodicidade, deter-

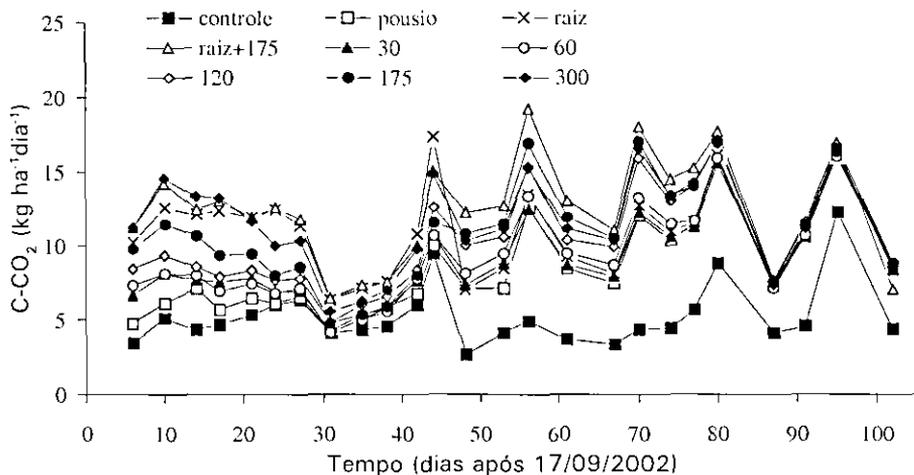


FIG. 3.2. Taxa de emissão diária de CO_2 durante o período experimental.

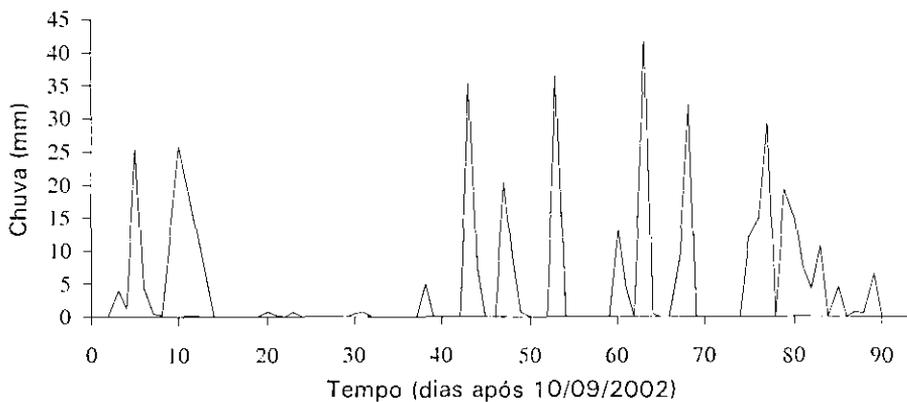


FIG. 3.3. Precipitação durante o período experimental.

minando condições favoráveis ao processo de decomposição dos resíduos, como demonstrando pelas taxas de emissão de CO_2 .

A partir do 80º dia, as emissões de CO_2 passaram a ser iguais para todos os tratamentos, indicando que o efeito dos tratamentos sobre a evolução de CO_2 havia sido completado num período relativamente curto. A análise ao final do ciclo evidenciou que a evolução total de CO_2 foi diretamente relacionada com o aumento das doses de N-tremoço (Fig. 3.4A). Contudo, a evolução de CO_2 expressa como percentagem do C aplicado diminuiu com o aumento da dose de N-tremoço (Fig. 3.4B), indicando que, quanto maior a quantidade de material, menor foi a sua taxa de decomposição e evolução de CO_2 . É provável que este efeito se deva à menor proporção de material vegetal em contato com o solo, à medida que a dose de resíduo foi aumentada.

As perdas de N-NH_3 , assim como observado para o C-CO_2 , foram relacionadas com a quantidade de material aplicado. A emissão de NH_3 acumulada chegou a 6 kg ha^{-1} de N para o tratamento "300" (Fig. 3.5). Foi observado que a presença das raízes teve pouca contribuição para a perda de NH_3 , uma vez que a emissão observada no tratamento "raiz" foi semelhante à do tratamento "pousio".

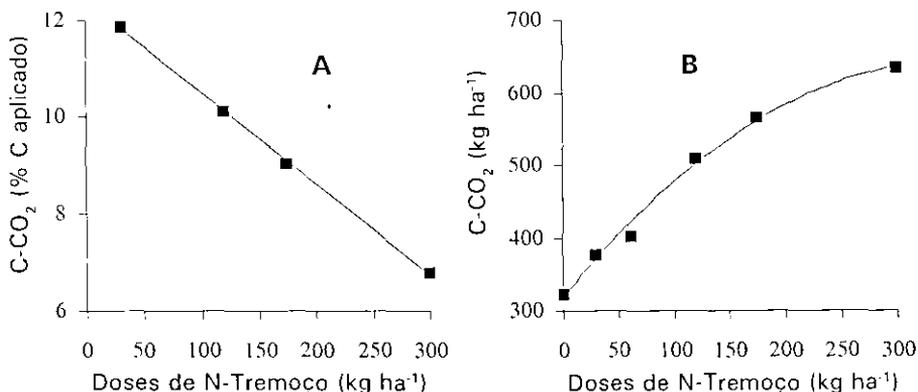


FIG. 3.4. Relação entre a evolução acumulada de CO_2 e doses de N-tremoço. (A) perdas como percentagem do carbono aplicado e (B) perdas totais.

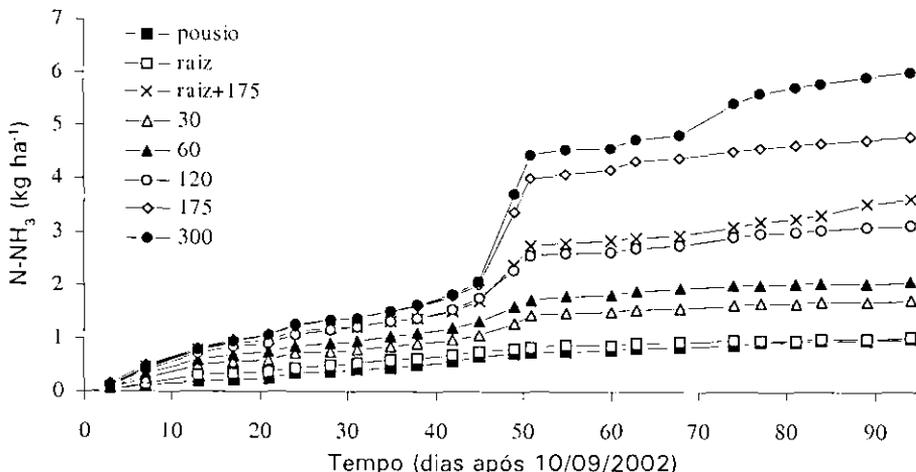


FIG. 3.5. Perda cumulativa de $N-NH_3$ durante o período experimental.

Observa-se que, assim como a emissão de CO_2 , a emissão de NH_3 também esteve associada à disponibilidade de água do solo, não tendo ultrapassado, no período inicial, 2% do N aplicado e, após o 45º dia, quando a periodicidade das chuvas foi maior, houve um incremento na emissão de NH_3 .

Como conclusões principais deste trabalho conduzido no Paraná tem-se que: 1) A decomposição dos resíduos de tremoço foi diretamente relacionada com a precipitação; 2) As taxas de emissão de CO_2 e de $N-NH_3$ foram diretamente relacionadas à quantidade de material aplicado, contudo, as perdas de $N-NH_3$ foram baixas quando comparadas ao montante de N aplicado na forma de tremoço.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Caixa Postal 231 - CEP 86001-970 - Londrina, PR
Fone (43) 3371-6000 Fax (43) 3371-6100
<http://www.cnpso.embrapa.br>
sac@cnpso.embrapa.br

**Ministério da Agricultura
Pecuária e Abastecimento**

