

Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 2003

Microbiologia de Solos



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Roberto Rodrigues

Ministro

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO

José Amauri Dimarzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Luiz Fernando Rigato Vasconcellos

Membros

Mauro Motta Durante

Secretário Geral

DIRETORIA-EXECUTIVA DA EMBRAPA

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Diretores

EMBRAPA SOJA

Vania Beatriz Rodrigues Castiglioni

Chefe Geral

João Flávio Veloso Silva

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Norman Neumaier

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

Heveraldo Camargo Mello

Chefe Adjunto de Administração

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:

Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja

Caixa Postal 231 - CEP 86 001-970

Telefone (43) 3371 6000 Fax (43) 3371 6100 Londrina, PR

e-mail: sac@cnpso.embrapa.br

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



ISSN 1516-781X
Novembro, 2004

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

Documentos243

Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja - 2003

Microbiologia de Solos

Organizado por:

Odilon Ferreira Saraiva
Embrapa Soja

Londrina, PR
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral
Caixa Postal 231
86001-970 - Londrina, PR
Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100
<http://www.cnpso.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpso.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *João Flávio Veloso Silva*
Secretaria executiva: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*
Membros: *Clara Beatriz Hoffmann-Campo*
George Gardner Brown
Waldir Pereira Dias
Ivan Carlos Corso
Décio Luis Gazzoni
Manoel Carlos Bassoi
Geraldo Estevam de Souza Carneiro
Léo Pires Ferreira
Supervisor editorial: *Odilon Ferreira Saraiva*
Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*
Editoração eletrônica: *Neide Makiko Furukawa*
Capa: *Danilo Estevão*

1^a Edição

1^a impressão 11/2004: tiragem: 150 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 – 2003:
microbiologia de solos / organizado por Odilon Ferreira
Saraiva. – Londrina: Embrapa Soja, 2004.
69p. : il. ; 21cm. – (Documentos / Embrapa Soja,
ISSN 1516-781X; n.243)

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

CDD 631.46

© Embrapa 2004

Apresentação

A publicação ***Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja***, editada anualmente, é 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 a campo são discutidas em reuniões específicas e repassadas para a assistência técnica e para os produtores rurais, como Sistemas de Produção ou outras publicações das séries Documentos ou Circular Técnica. As de caráter emergencial são divulgadas na forma de Comunicado Técnico e na *home page* da Embrapa Soja. 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 vários volumes, contemplando os resultados dos projetos de uma área específica de conhecimento ou de áreas correlatas. O presente volume apresenta os resultados obtidos em 2003, na área de Microbiologia de Solos.

João Flávio Veloso Silva

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

Sumário

1 ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA	7
1.1 Identificação de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum/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>Brayrhizobium</i> (06.04.01.338-01)	7
1.2 Desempenho simbiótico de cultivares de soja e busca de marcadores moleculares relacionados à fixação biológica do nitrogênio (06.04.01.338-02)	16
1.3 Microrganismos associativos promotores do crescimento de soja (06.04.01.338-03)	20
2 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	31
2.1 Avaliação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> , inoculantes microbianos e métodos de inoculação, em diferentes regiões do Brasil (04.2001.340-01)	32
2.2 Compatibilidade de aplicação de inoculantes com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.2001.340-02)	45
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 INOCULAÇÃO59**

- 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 (06.04.01.327-03)62

1

ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA

Nº do Projeto: 06.04.01.338

Líder: Mariangela Hungria

Número de subprojetos que compõem o projeto: 06

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja; Embrapa Trigo; Embrapa Agrobiologia; Embrapa Cerrados

Parceiros indiretos: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); UFPR (Universidade Federal do Paraná, Depto. de Bioquímica e Depto de Genética); UEL (Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Microbiologia e Depto. de Engenharia Elétrica); FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária); Unifil (Centro Universitário Filadélfia); UFMT/FCAV (Universidade Federal do Mato Grosso, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias).

1.1 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 *Brayrhizobium* (06.04.01.338-01)

Mariangela Hungria; Rubens José Campo; Ligia Maria O. Chueire;
Eliane V. Bangel¹; Lygia V. Galli-Terasawa²; Chirley Glienke-Blanco²;
Iêda C. Mendes³; Mariana G. Germano⁴; Carlos D. Maciel⁵;
Maria de Fátima Loureiro⁶

¹ FEPAGRO

² UFPR-Depto. de Genética

³ Embrapa Cerrados

⁴ Aluna de mestrado em Microbiologia da UEL

⁵ UEL

⁶ UFMT

Este subprojeto foi conduzido no período de 2001 a 2003 e aqui será apresentado o resumo dos principais resultados obtidos. Sabe-se que a soja pode suprir suas necessidades de N pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) (FBN), realizado pela simbiose com bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. Com a expansão da cultura da soja no Brasil, foi constatada a ausência, em solos brasileiros, de estírpes capazes de estabelecer uma simbiose efetiva com essa leguminosa. Consequentemente, foram trazidos, do exterior, inoculantes contendo estírpes de *Bradyrhizobium*. Concomitantemente, porém, iniciaram-se trabalhos de pesquisa para identificar estírpes adaptadas aos solos e às cultivares brasileiras, sendo constatado que as bactérias carregadas nos inoculantes comerciais satisfazem as necessidades da soja pelo nutriente N, não sendo necessária nenhuma complementação com fertilizantes nitrogenados. Contudo, com os novos patamares de produtividade atingidos pela cultura no Brasil e com o estabelecimento, no solo, de uma população de estírpes que já não são as mais eficientes, mas que foram introduzidas por inoculações anteriores, torna-se necessário desenvolver diversas linhas de pesquisa para incrementar os níveis de FBN encontrados atualmente. Nesse contexto, visando maximizar a FBN, este subprojeto apresentou dois objetivos principais: 1) identificar estírpes de *Bradyrhizobium japonicum/B. elkanii* com maior capacidade de FBN e competitividade para a cultura da soja; e 2) avaliar as respostas à reinoculação em áreas com populações distintas de *Bradyrhizobium*.

Em relação ao primeiro objetivo, inicialmente desenvolveram-se estudos visando a caracterização genética de estírpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, incluindo aquelas capazes de nodular a soja, para aumentar os conhecimentos relativos ao microssimbionte. Foram caracterizadas 119 estírpes provenientes da coleção nacional de culturas de rizóbios da FEPAGRO, da Embrapa Tabuleiros Costeiros e do INPA. Essas estírpes foram isoladas de 33 espécies de leguminosas, representando nove tribos e incluindo as três subfamílias dessa família (Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinoideae); 41 delas são recomendadas como as mais eficientes para uso em inoculantes comerciais

para diversas leguminosas. As regiões do DNA que codificam os genes ribossomais 16S rRNA, 23S rRNA e o espaço intergênico 16S-23S rRNA das estirpes foram amplificadas pela reação de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), seguida pela análise por RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), com três enzimas de restrição para cada região: *Cfol*, *MspI* e *DdeI* (16S rRNA); *HhaI* (= *Cfol*), *HaeIII* e *HinfI* (23S rRNA) e *MspI*, *DdeI* and *HaeIII* (IGS). Os géis obtidos foram fotografados sob luz ultravioleta.

As análises foram feitas para cada região, havendo certa similaridade entre os resultados obtidos, embora maior variabilidade tenha sido observada na região do 23S rRNA. Considerando uma abordagem polifásica com as três regiões ribossomais estudadas, observou-se a formação de dois grandes grupos, relacionados às espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, unidos em um nível de similaridade de 54% e 46%, respectivamente. Contudo, subgrupos foram definidos nesses grupos e podem estar relacionados à variabilidade intraespecífica, ou a novas subespécies, ou mesmo a novas espécies, uma vez que a similaridade final do agrupamento é considerada baixa. Além disso, pelo menos dois novos agrupamentos foram observados e podem representar novas espécies. A maioria dos isolados de soja apresentou maior similaridade com representantes da espécie *B. japonicum*, enquanto que a maioria das estirpes de outras leguminosas apresentou semelhança com *B. elkanii*, ou foi posicionada nos novos agrupamentos detectados. A coleção de estirpes de *Bradyrhizobium* analisada neste estudo mostrou um grau de variabilidade genética nunca relatado anteriormente, confirmado o grau elevado de biodiversidade microbiana nos trópicos.

No ano de 2003 foi dada ênfase, ainda, ao estabelecimento de metodologias adequadas para o estudo da diversidade de rizóbios. Os resultados obtidos na análise das regiões ribossomais das 119 estirpes de *Bradyrhizobium* foram submetidos à análise multivariada e as matrizes obtidas foram comparadas entre si, avaliando-se as correlações entre as mesmas. A análise de componentes principais também foi aplicada às matrizes obtidas, visando identificar a contribuição de cada componente para o resultado obtido pela abordagem polifásica. A matriz de correlação obtida pelas diversas análises é apresentada na Tabela 1.1

TABELA 1.1. Matriz de semelhança, determinada pelas correlações entre as matrizes obtidas pela amplificação de cada região ribossomal, seguida pela restrição com cada enzima, em 119 estírpes de *Bradyrhizobium*.

Enzima de restrição/ região ribossômica	<i>Hhal</i> 23S	<i>HaeIII</i> 23S	<i>Ddel</i> 16S	<i>HinfI</i> 23S	<i>HaeIII</i> IGS	<i>Ddel</i> IGS	<i>MspI</i> IGS	<i>MspI</i> 16S	<i>Cfol</i> 16S
<i>Hhal</i> - 23S	100,0	47,5	43,3	32,4	5,0	21,1	18,4	19,2	5,6
<i>HaeIII</i> - 23S	47,5	100,0	38,0	32,9	10,0	17,1	17,7	12,4	8,6
<i>Ddel</i> - 16S	43,3	38,0	100,0	34,4	13,7	23,5	16,9	23,8	9,2
<i>HinfI</i> - 23S	32,4	32,9	34,4	100,0	26,9	25,1	26,5	16,3	6,9
<i>HaeIII</i> - IGS	5,0	10,0	13,7	26,9	100,0	30,7	27,8	9,2	9,0
<i>Ddel</i> - IGS	21,1	17,1	23,5	25,1	30,7	100,0	33,5	10,7	5,7
<i>MspI</i> - IGS	18,4	17,7	16,9	26,5	27,8	33,5	100,0	11,2	5,9
<i>MspI</i> - 16S	19,2	12,4	23,8	16,3	9,2	10,7	11,2	100,0	4,8
<i>Cfol</i> - 16S	5,6	8,6	9,2	6,9	9,0	5,7	5,9	4,8	100,0

e, aplicando-se a técnica dos componentes principais à mesma, obtém-se a Tabela 1.2. Observa-se que, apesar da análise de componentes principais concentrar a variação dos dados nos primeiros componentes, seria necessário o uso dos seis primeiros componentes para um acúmulo de variância superior a 80% (Tabela 1.2). De um modo geral, nenhuma das análises se destacou das demais, embora o último componente seja responsável por, aproximadamente, 5% da variação total e o primeiro componente, por 30%. Considerando o primeiro componente observa-se, ainda, que a região do gene 23S rRNA foi a que contribuiu com os maiores coeficientes da combinação dos componentes. Já no segundo componente, a região que mais contribuiu foi a do espaço intergênico. Pode-se concluir, portanto, que a metodologia de RFLP-PCR de regiões ribossomais, com a análise pelo menos seis componentes, é adequada para a avaliação da biodiversidade de rizóbios em regiões tropicais.

Ainda em relação ao microssimbionte, realizou-se um estudo com cem isolados de rizóbios capturados por plantas de soja inoculadas com um solo dos Cerrados, visando compreender as alterações que ocorrem na população de rizóbio em áreas inoculadas. O solo era, originalmente, isento de rizóbio capaz de nodular a soja e há 15 anos havia recebido inoculante contendo as estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019. Desde então, a área vem sendo cultivada anualmente com a soja, mas não recebeu inoculante pelos últimos sete anos, apresentando, na época da coleta, uma população estimada em 10^4 células/g solo. Foi constatada grande variabilidade entre os isolados, com 13 grupos sorológicos distintos, 12 grupos de perfil protéico e sete de lipopolissacarídeos e não mais que cinco isolados apresentaram características semelhantes. Além disso, 48% dos isolados apresentaram reações sorológicas múltiplas contra os sorogrupos das estirpes estabelecidas nos solos brasileiros. Também 40% dos isolados reagiram com o antissoro da estirpe de *B. japonicum* SEMIA 566, que nunca foi introduzida no solo, provavelmente pela dispersão a partir de outras áreas, associada a sua alta competência saprofítica; 13% dos isolados não reagiram sorologicamente com nenhum dos antissoros testados. Um terço dos isolados apresentou crescimento rápido e reação ácida em meio de

TABELA 1.2. Coeficientes de ponderação, obtidos pela aplicação de componentes principais à matriz de semelhança obtida pelas análises por RFLP-PCR das regiões ribossomais.

CP ¹	Variância autovalor	Variância acumulada	Coeficiente de ponderação associado a:								
			Hhal ²	HaeIII ²	Ddel ³	HinfI ²	HaeIII ⁴	Ddel ⁴	MspI ⁴	MspI ³	Cfol ³
Y ₁	2,695	0,299	0,405	0,389	0,411	0,404	0,264	0,335	0,318	0,230	0,114
Y ₂	1,264	0,439	0,389	0,342	0,271	-0,036	-0,559	-0,393	-0,410	0,126	-0,064
Y ₃	0,983	0,549	0,079	0,013	-0,018	0,067	-0,038	0,129	0,126	-0,082	-0,973
Y ₄	0,919	0,651	0,137	0,303	-0,059	0,077	-0,045	0,049	0,049	-0,927	0,115
Y ₅	0,751	0,734	0,174	-0,029	-0,069	-0,511	-0,535	0,393	0,494	0,065	0,111
Y ₆	0,691	0,811	-0,037	0,125	-0,329	0,303	-0,131	-0,613	0,616	0,091	0,021
Y ₇	0,616	0,880	-0,148	-0,497	0,222	0,615	-0,501	0,185	-0,001	-0,104	0,072
Y ₈	0,577	0,944	0,094	0,269	-0,739	0,303	-0,149	0,362	-0,295	0,191	0,046
Y ₉	0,501	1,000	-0,771	0,549	0,207	0,003	-0,191	0,127	0,028	0,065	-0,036

¹ Componentes principais.

² 23S rRNA, ³16S rRNA e ⁴IGS, espaço intergênico 16S-23S rRNA.

cultura contendo manitol como fonte de carbono, embora também apresentasse outras características de *Bradyrhizobium*. A nodulação e a capacidade de FBN variaram consideravelmente entre os isolados. Variabilidade genética elevada foi constatada quando os DNAs dos isolados foram amplificados com os oligonucleotídeos BOX (que amplifica regiões repetitivas e conservadas) e RPO1 (que amplifica genes da fixação de N₂, genes *nif*) e diversos isolados ocuparam agrupamentos bastante distintos na análise de cada região. A diversidade elevada foi atribuída tanto à transferência lateral de genes entre as estirpes nativas e as dos inoculantes, como a rearranjamntos genômicos durante o processo de adaptação aos solos dos Cerrados, podendo desempenhar papel importante como tampão biológico, evitando a dominância de uma determinada estirpe no solo.

Ainda no objetivo 1 foram conduzidos, por dois anos, ensaios com quatro estirpes promissoras de *B. japonicum* para a cultura da soja, duas pertencentes ao sorogrupo SEMIA 566, CPAC 40 (=S-372) e CPAC 42 (S-381) e duas pertencentes ao sorogrupo SEMIA 586 (=CB 1809), CPAC 44 (S-394) e CPAC 45 (S-402). Os resultados obtidos em dois anos foram promissores (Tabela 1.3), com incrementos na nodulação e no rendimento de grãos pela inoculação com essas estirpes, contudo, os resultados ainda não são suficientes para a recomendação das estirpes, uma vez que os ensaios precisam ser conduzidos também na Região Centro-Oeste e houve limitação de recursos.

Em relação ao segundo objetivo do projeto, foi dada ênfase à condução de ensaios que incluíssem tratamentos com aplicação suplementar de fertilizante nitrogenado. Isso foi feito por causa da demanda crescente, por parte dos agricultores, sobre a necessidade, ou não, de complementação com fertilizantes nitrogenados para atingir altos rendimentos. Foram conduzidos 17 experimentos em Londrina, Ponta Grossa (PR) e Jaciara (MT), em solos com população estabelecida de *B. japonicum/B. elkanii*, estimada em, no mínimo, 10³ células/g de solo. Todos os experimentos incluíram um controle não inoculado e sementes inoculadas com uma mistura das estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5080 (=CPAC 7). Os tratamentos com fertilizantes nitrogenados consistiram de: 1) 30 kg de N na semeadura; 2)

TABELA 1.3. Efeito da inoculação de soja, cultivar BRS 133, com estíries de *Bradyrhizobium japonicum/B. elkanii* nos parâmetros de número de nódulos (NN) e massa de nódulos secos (MNS) avaliados no estádio R2 e na produtividade e teor de N total dos grãos (NTG). Médias de ensaios conduzidos em 2000/2001 e 2001/2002 em Londrina, PR, em solo com população estabelecida de bradírrizóbio de 10^3 células/g de solo¹.

Tratamento	NN (nº/pl)	MNS (mg/pl)	Produtividade (kg/ha)	NTG (kg N/ha)
SEMIA 5019 + SEMIA 587	60 a	119 ab	3.450 a	155 b
SEMIA 5079 + SEMIA 5080	69 a	130 a	3.425 a	154 b
SEMIA 566	68 a	100 ab	2.610 b	105 c
CPAC 40 + CPAC 42	72 a	128 a	3.580 a	157 b
SEMIA 586	38 b	48 c	2.408 b	118 c
CPAC 44 + CPAC 45	55 ab	91 b	3.567 a	175 a
Não inoculado	18 c	17 cd	1.624 c	57 d
Não inoculado + N ²	5 c	9 d	3.525 a	148 b
d.m.s	19	31	315	14
CV (%)	33	30	9	9

¹ Médias de seis repetições em cada safra e valores seguidos pela mesma letra não diferiram estatisticamente (Duncan, $P \leq 0.05$).

² 200 kg de N/ha como uréia, divididos em duas vezes, metade na semeadura e metade no florescimento.

100 kg de N na semeadura e 100 kg de N no florescimento; 3) 50 kg de N no pré-florescimento; 4) 50 kg de N no estágio inicial de enchimento dos grãos. O fertilizante foi colocado na forma de uréia. Além disso, os ensaios foram conduzidos sob os sistemas de semeadura direta ou convencional, com uma cultivar de ciclo mais curto (EMBRAPA 48) e outra de ciclo mais longo (BRS 134). A reinoculação aumentou o rendimento no MT, indicando a necessidade de reinoculação, particularmente em condições de estresse ambiental, como temperaturas elevadas e baixa umidade do solo. A aplicação de fertilizante nitrogenado

não incrementou o rendimento em nenhum dos experimentos analisados e a ausência de resposta à adubação ocorreu tanto em condições de semeadura direta, como em semeadura convencional e em ambas as cultivares. Pode-se concluir, portanto, que a adubação nitrogenada da cultura da soja, na semeadura (30 kg N/ha), no florescimento ou no enchimento dos grãos (50 kg de N/ha) é desnecessária e, portanto, não recomendada pela pesquisa, pois implica em aumento de custos para o agricultor, sem resultar em retorno econômico. Pode-se concluir, ainda, que a fixação biológica do N₂ com as estirpes recomendadas atualmente pela pesquisa consegue suprir as necessidades das cultivares atuais da soja em N.

1.1.1 Principais conclusões e recomendações

- 1) A diversidade genética de *Bradyrhizobium* em solos tropicais é elevada, havendo indicação de novas espécies.
- 2) A metodologia de RFLP-PCR de regiões ribossomais, com a análise de pelo menos seis componentes, é adequada para a avaliação da biodiversidade de rizóbios em regiões tropicais.
- 3) Recomenda-se que seja dada prioridade elevada às pesquisas para bioprospecção da diversidade de rizóbios nos trópicos.
- 4) Existe dispersão de estirpes inoculantes provenientes de outras áreas cultivadas, bem como variabilidade genética em função da adaptação aos solos.
- 5) Há indicação de transferência lateral de genes entre as estirpes inoculadas e rizóbios nativos dos Cerrados.
- 6) 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 e afetando, portanto, as respostas à reinoculação.
- 7) Recomenda-se que sejam desenvolvidos mais estudos para estimar a magnitude em que ocorrem os processos de recombinação

- gênica e transferência lateral de genes em populações de rizóbios em solos brasileiros.
- 8) Foram identificadas estirpes de *Bradyrhizobium* promissoras para as novas cultivares de soja, com maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio.
 - 9) Recomenda-se que os ensaios com estirpes promissoras de *Bradyrhizobium* tenham continuidade.
 - 10) A FBN com as estirpes atualmente recomendadas pela pesquisa é capaz de suprir as necessidades da cultura da soja em N. Desse modo, a adubação nitrogenada na semeadura (30 kg N/ha), no florescimento ou no enchimento dos grãos (50 kg N/ha) é desnecessária e, portanto, não recomendada pela pesquisa, pois implica em aumento de custos para o agricultor, sem resultar em retorno econômico.



1.2 Desempenho simbiótico de cultivares de soja e busca de marcadores moleculares relacionados à fixação biológica do nitrogênio (06.04.01.338-02)

Mariangela Hungria; Marisa F. Nicolás¹; Rubens José Campo;
Carlos Alberto Arrabal Arias

Este subprojeto foi conduzido no período de 2001 a 2003 e aqui será apresentado o resumo dos principais resultados obtidos nesse período. No Brasil, embora os estudos pioneiros, na década de 1960, tivessem citado diferenças entre cultivares de soja na capacidade de fixação biológica do N₂ (FBN), poucos trabalhos foram conduzidos posteriormente sobre a simbiose. Recentemente, porém, foi constatada grande variabilidade, entre as cultivares de soja, quanto ao desempenho simbiótico, bem como que algumas novas cultivares apresentavam reduzida capacidade de FBN, quando comparadas às suas

¹ Bolsista de pós-doutorado do CNPq

respectivas parentais. Os estudos tiveram continuidade neste subprojeto. Quando 160 cultivares de soja foram inoculadas com a estirpe SEMIA 5080 (= CPAC 7), foram confirmadas diferenças significativas entre as mesmas na capacidade de FBN, na mesma magnitude observada anteriormente, quando essas mesmas cultivares foram inoculadas com as estirpes SEMIA 587, SEMIA 566 (mesmo sorogrupo da SEMIA 5079) e SEMIA 5019 (= 29w). Além disso, também não foi constatada restrição à nodulação com a SEMIA 5080, em nenhuma das cultivares estudadas.

Neste subprojeto, foram realizadas, também, 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), em que foram considerados os parâmetros de número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação entre esses parâmetros (MNS/NN), bem como a massa da parte aérea seca (MPAS). Não foram constatadas diferenças significativas entre os efeitos diretos e recíprocos, consequentemente, os dados das plantas F_2 e F_3 foram agrupados. As freqüências de distribuição em F_3 foram normais e contínuas, consistentes com herança poligênica. Houve predominância dos efeitos genéticos aditivo [d] e/ou D (variância genética aditiva), na maioria das variáveis testadas, exceto por MNS no cruzamento J-200 x Bossier. Os efeitos genéticos dominantes [h] e/ou H (variância genética de dominância) foram detectados em todos os cruzamentos de Embrapa 20 x BRS 133 e para MNS/NN em Bossier x Embrapa 20. Efeitos do tipo epistasia aditiva x aditiva [i] e interação genótipo x microambiente foram menos freqüentes. As estimativas de herdabilidade no senso restrito variaram de 39% a 77%, sendo maiores para NN e MNS em Bossier x Embrapa 20, e para MPAS, em Embrapa 20 x BRS 133, com valores superiores a outros relatados na literatura, tanto para soja, como para outras leguminosas. A predição do potencial genético de obtenção de linhagens superiores para BNF indicou que os cruzamentos mais efetivos seriam Bossier x Embrapa 20 e Embrapa 20 x BRS 133.

Inicialmente, o cruzamento Embrapa 20 x BRS 133 foi utilizado para a busca de marcadores moleculares do tipo QTLs (Quantitative Trait Loci,

locos controladores de característica quantitativa), feito pela amplificação com "primers" do tipo microssatélites (SSR, simple sequence repeat) em plantas F₃. Foram utilizados 252 marcadores SSR. Dos 89 marcadores SSR que revelaram polimorfismo com os DNAs das parentais, foram escolhidos 45, que produziram os melhores perfis eletroforéticos, permitindo maior diferenciação das bandas polimórficas. Vinte e um marcadores SSR foram mapeados com um valor de LOD (likelihood-of-odds) de 3.0 e uma distância máxima de Haldane de 50 cM e foram distribuídos em nove grupos de ligação, em uma região de 251.2 cM. A análise de intervalos com o Mapmaker/QTL revelou duas regiões genômicas associadas com o NN e a MNS, com uma contribuição dos QTLs putativos de 7,1% e 10%, respectivamente. A análise de regressão identificou 13 associações entre os QTLs devido aos efeitos aditivos, com alguns deles sendo associados significativamente com mais de um parâmetro fenotípico. A análise de variância com um fator também detectou 13 associações significativas, associadas aos efeitos de dominância. A análise ANOVA com dois fatores mostrou seis interações epistáticas entre QTLs não ligados para MNS, NN e MPAS, explicando até 15% dos caracteres e aumentando a expressão fenotípica de 8% para 28%. Os dados obtidos nesse estudo indicam que a seleção assistida por marcadores do tipo microssatélites pode ser adequada para aumentar a contribuição da FBN e os marcadores associados significativamente com a FBN identificados neste subprojeto poderão ser utilizados nos programas de melhoramento. Linhagens com maior capacidade de FBN foram obtidas a partir dos cruzamentos de Bossier x Embrapa 20 e Embrapa 20 X BRS 133 e deverão ser incorporadas nos ensaios regionais do programa de melhoramento da Embrapa Soja, visando a avaliação de seu desempenho frente a outras cultivares.

1.2.1 Principais conclusões e recomendações

- 1) A análise com 160 cultivares de soja em simbiose com a estirpe SEMIA 5080 (= CPAC 7) de *Bradyrhizobium japonicum* indicou variabilidade elevada em relação aos parâmetros de fixação biológica do N₂ (FBN).

- 2) A análise de 160 cultivares de soja em simbiose com a estirpe SEMIA 5080 indicou a ausência de genes de restrição das plantas à nodulação com essa estirpe.
- 3) A análise de parâmetros de FBN em 12 dialelos completos, entre materiais contrastantes, J-200 e Bossier (alta FBN), Embrapa 20 (média) e BRS 133 (baixa) indicou que as freqüências de distribuição em F_3 foram normais e contínuas, consistentes com herança poligênica.
- 4) No estudo com os 12 dialelos completos, as estimativas de herdabilidade no senso restrito variaram de 39% a 77%, sendo maiores para NN e MNS, em Bossier x Embrapa 20, e para MPAS, em Embrapa 20 x BRS 133, valores considerados elevados em relação aos já relatados na literatura.
- 5) A análise com “primers” do tipo microssatélites (SSR, “Simple Sequence Repeat”) no cruzamento de Embrapa 20 X BRS 133 identificou 13 QTLs (“Quantitative Trait Loci”) associados significativamente com a FBN.
- 6) Recomenda-se que tenham continuidade os estudos para confirmar se os QTLs associados à FBN identificados em Embrapa 20 X BRS 133 também estão presentes no cruzamento de Bossier X Embrapa 20 e em outras cultivares modernas e genótipos não melhorados, visando o uso futuro desses marcadores em análises nos programas de melhoramento.
- 7) Foram obtidas linhagens com maior potencial de FBN, a partir dos cruzamentos de Embrapa 20 X BRS 133 e Bossier X Embrapa 20.
- 8) Recomenda-se que as linhagens com maior potencial de FBN identificadas no cruzamentos de Embrapa 20 X BRS 133 e Bossier X Embrapa 20 sejam utilizadas nos ensaios regionais do programa de melhoramento da Embrapa Soja, visando a avaliação de seu desempenho frente a outras cultivares.

1.3 Microrganismos associativos promotores do crescimento de soja (06.04.01.338-03)

Alexandre José Cattelan; Mariangela Hungria; 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 bactérias promotoras do crescimento de plantas. Isso ocorre porque essas bactérias protegem as plantas contra microrganismos patogênicos, solubilizam nutrientes do solo, produzem hormônios vegetais ou apresentam efeito sinergístico com a fixação simbiótica do nitrogênio, no caso das leguminosas, como a soja.

Este subprojeto visou obter isolados de bactérias benéficos à cultura da soja e/ou do trigo visando futura utilização como inoculantes microbianos.

No primeiro ano de condução do subprojeto foram obtidos 20 isolados de bactérias relacionadas à promoção do crescimento de soja (P34 a P53) e, no segundo ano, mais 20 (P54 a P73), totalizando 40 isolados. Os outros isolados/estirpes aqui estudados foram selecionados em estudos anteriores.

Os novos isolados foram caracterizadas, *in vitro*, quanto à solubilização de fosfato, produção de ACC Deaminase, de ácido indol acético, de sideróforos, de *B*-1,3-glucanase e de quitina e quanto ao antagonismo aos fungos patogênicos *Fusarium solani* f.sp. *glycines* e *Phiallophora gregata* e testados em casa de vegetação para controle da podridão vermelha da raiz, promoção do crescimento de plantas de soja, solubilização de fosfatos e controle de nematóides.

¹Embrapa Soja, ²UNIFIL

Os isolados que mais se destacaram nos testes *in vitro* e em casa de vegetação foram testados a campo em soja e trigo em Londrina e Ponta Grossa, PR), sob diferentes condições.

1.3.1 Testes *in vitro*

a. Teste para produção de sideróforos

Os isolados positivos para o teste de produção de sideróforos foram P01, P07, P12, P14, P15, P16, P18, P20, P26, P39, P44 e P51.

b. Teste para produção de *B*-1,3-glucanase

Vinte e seis isolados apresentaram reação positiva quanto à produção de *B*-1,3-glucanase, sendo os mesmos P01, P02, P06, P07, P09, P12, P13, P14, P15, P18, P19, P20, P25, P26, P27, P30, P31, P32, P33, P39, P40, P45, P46, P47, P50 e P52.

c. Teste para produção de quitinase

Quanto à produção de quitinase, apenas os isolados P23, P24 e P31 apresentaram reação positiva.

1.3.2 Testes em casa de vegetação

a. Teste para controle dos nematóides de galha e de cisto em soja, em casa de vegetação

Vinte e oito isolados foram testados para o controle do nematóide de cisto (*Heterodera glycines* raça 3) e de galha (*Meloidogyne javanica*), em casa de vegetação. Em cada vaso contendo 3 kg de substrato esterilizado, foram colocadas três sementes de soja cvs. Lee 68 (nematóide de cisto) e BRS 133 (nematóide de galha) imersas na suspensão de células de cada um dos isolados. Também foram incluídos dois tratamentos testemunhas, com sementes imersas somente em solução tampão, sendo um contaminado com nematóide e o outro não. O delineamento experimental foi completamente casualizado com dez repetições. Após sete dias da semeadura, as plantas foram desbastadas para uma por vaso e inoculadas com 3.000 ovos de nematóides.

As plantas foram colhidas aos 35 dias após a inoculação, sendo feitas as seguintes avaliações: massa das raízes e da parte aérea secas e contagem do número de ovos (galha) ou fêmeas do nematóide (cisto).

Sete isolados (GN 1201, P 53, P 54, P 59, P 66, P 72 e LW 2301) inibiram significativamente a multiplicação do nematóide de cisto (Tabela 1.4). A maior inibição (56%) ocorreu quando as sementes foram inoculadas com o isolado LW2301. Embora muitos isolados tenham inibido a multiplicação do nematóide de galha, nenhum o fez de forma significativa (Tabela 1.5). A maior inibição (72%) ocorreu com a inoculação do isolado P70. As massas da parte aérea e das raízes não foram significativamente afetadas pelos tratamentos, quando comparadas com o tratamento com a presença do nematóide e sem inoculação das bactérias.

1.3.3 Testes a campo

Seis isolados (GN1201, GN2214, LN3212, AB202, P21 e P53) foram testados a campo em Londrina e Ponta Grossa, PR. Para os testes em solo com presença de *Fusarium* spp., foram também incluídos os isolados P07, P22, P43, BA227 e LN1116. Foram preparados inoculantes à base de turfa para cada isolado.

Quatro ensaios foram instalados em dois locais no Estado do Paraná: um na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, em Latossolo Roxo, e outros três, na estação experimental da Embrapa Transferência de Tecnologias, em Ponta Grossa: dois em Latossolo Vermelho-Escuro, sendo uma área com adubação fosfatada normal e outra com histórico de fusariose (doenças causadas pela presença de *Fusarium* spp., como podridões radiculares e a síndrome da morte súbita), e um terceiro em Latossolo Vermelho-Amarelo com baixo fósforo. As áreas receberam adubação com KCl e superfosfato triplo nas doses recomendadas, com exceção do experimento com baixo fósforo, que foi adubado com fosfato de rocha de Argélia, na dose equivalente à 80 kg de $P_2O_5\text{ ha}^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, com cinco repetições e parcelas de 4,0 por 6,0 m.

TABELA 1.4. Número de fêmeas de *Heterodera glycines*, massa de raízes e da parte aérea secas, obtidos após a incubação com 28 isolados de bactérias rizosféricas promotoras do crescimento, em casa de vegetação. Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Número de cistos (nº/planta)	Massa das raízes secas (mg/planta)	Massa da parte aérea seca (g/planta)
GN 2214	148a ¹	328a-c ¹	2,338NS ²
P 56	142ab	214c-e	2,509
P 61	132ab	209c-e	2,418
Controle com nematóide	130ab	288a-d	2,217
P 55	129a-c	257a-e	2,172
P 64	127a-d	232c-e	2,156
P 67	118a-e	206c-e	2,030
P 62	113a-f	193c-e	2,353
P 68	112a-f	194c-e	2,010
P 65	110a-f	236b-e	2,150
P 74	107a-f	287a-d	2,474
P 60	102a-f	280a-d	2,377
P 57	101a-f	213c-e	2,151
P 71	98a-f	153de	2,142
P 69	97a-f	160de	2,142
P 73	97a-f	211c-e	2,222
LN 3212	97a-f	302a-c	2,474
P 63	95a-f	201c-e	1,999
P 21	95a-f	283a-d	2,052
P 70	89a-f	187c-e	1,803
P 58	87b-f	206c-e	2,109
GN 1201	70c-f	251a-e	1,988
P 53	69d-f	193c-e	1,935
P 66	68d-f	292a-d	2,128
P 72	66ef	231c-e	1,990
P 54	63ef	189c-e	2,092
P 59	58e-g	136e	2,076
LW 2301	57fg	379a	2,516
Controle sem nematóide	0g	374ab	2,290

¹ Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

² As médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste F, ao nível de 5%.

TABELA 1.5. Número de fêmeas de *Meloidogyne javanica* e peso da parte aérea seca, obtidos após a incubação com 28 isolados de bactérias promotoras do crescimento, em casa de vegetação. Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Número de ovos e larvas (nº/planta)	Massa da parte aérea seca (g/planta)
P 61	18.168a ¹	1,012b-d ¹
LN 3212	15.590ab	1,119a-d
P 59	14.760a-c	0,841cd
P 62	13.848a-d	1,103a-d
P 54	13.752a-d	1,181a-d
P 71	12.816a-e	0,978b-d
GN 1201	10.813a-f	1,097a-d
P 56	10.344a-f	1,187a-d
P 21	9.000a-g	0,774d
P 55	8.424b-g	1,337ab
P 67	8.196b-g	1,208a-d
Controle com nematóide	7.824b-g	1,110a-d
P 58	7.416b-g	1,276a-c
P 65	7.392b-g	0,971b-d
P 57	6.962b-g	1,305ab
P 68	6.738b-g	0,910b-d
P 69	6.648b-g	1,020b-d
GN 2214	6.384b-g	0,900b-d
P 53	6.200b-g	1,077a-d
P 64	5.568c-g	1,331ab
LW 2301	5.472c-g	1,102a-d
P 73	5.352c-g	1,219a-d
P 63	4.830d-g	0,958b-d
P 66	3.936e-g	1,159a-d
P 72	3.576e-g	0,993b-d
P 74	3.288e-g	1,110a-d
P 60	2.688fg	0,967b-d
P 70	2.232fg	1,330ab
Controle sem nematóide	0g	1,513a

¹ Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Sementes de soja cv. BRS 156 e BRS 154 (para área com fusarioses) 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 *Bradyrhizobium* spp., estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5080, produzidos pela FEPAGRO. A testemunha foi inoculada apenas com *Bradyrhizobium* spp. Ao redor dos 30 dias após a emergência, 20 plantas por parcela foram arrancadas com o sistema radicular intacto para avaliação da altura, nodulação e desenvolvimento das raízes e da parte aérea. Quando as plantas estavam em maturação fisiológica, avaliam-se o rendimento de grãos (corrigido para 13% de umidade) e a massa de 100 grãos. Na área de baixo P, também avaliou-se o teor de P nos grãos.

No ensaio de Londrina, na safra 2002/03, os isolados testados não afetaram significativamente nenhum dos parâmetro avaliados nas plantas de soja (Tabela 1.6). Fato semelhante ocorreu no ensaio de Ponta Grossa, sob condições normais. O único efeito significativo dos tratamentos

TABELA 1.6. Nodulação, desenvolvimento vegetativo e rendimento de grãos de plantas de soja cv. BRS 156 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Londrina, PR, safra 2002/03.

Tratamento	Número de nódulos (nº/pl)	Massa nódulos secos (mg/pl)	Massa raízes secas (mg/pl)	Altura de plantas (cm)	Massa p. aérea seca (mg/pl)	Rendim. de grãos (kg/ha)
Testemunha	10,9 ^{NS}	34 ^{NS}	250 ^{NS}	14,2 ^{NS}	799 ^{NS}	2.833 ^{NS}
GN1201	10,7	31	228	13,3	679	2.582
GN2214	10,6	34	261	14,3	886	2.712
P21	9,4	34	258	13,6	859	2.809
P53	9,5	29	277	14,5	932	2.756
LN3212	10,0	33	248	14,0	733	2.756
AB202	10,9	35	268	14,4	907	2.861

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

nesse local foi a diminuição da altura de plantas pelo isolado P53 (Tabela 1.7). Os isolados GN1201 e P21 aumentaram o rendimento de grãos de soja em mais de 140 kg/ha, porém, de forma não significativa.

TABELA 1.7. Nodulação, desenvolvimento vegetativo e rendimento de grãos de plantas de soja cv. BRS 156 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Ponta Grossa (condições normais), PR, safra 2002/03.

Tratamento	Número de nódulos (nº/pl)	Massa secos (mg/pl)	Massa raízes secas (mg/pl)	Altura de plantas (cm)	Massa p. aérea seca (mg/pl)	Rendim. de grãos (kg/ha)
Testemunha	17,4 ^{NS}	109 ^{NS}	545 ^{NS}	19,5a [#]	2.311 ^{NS}	2.311 ^{NS}
GN1201	15,4	91	558	19,6a	2.390	2.472
GN2214	16,2	105	535	20,7a	2.409	2.308
P21	17,2	106	631	19,3a	2.707	2.456
P53	18,7	123	589	17,5b	2.412	2.277
LN3212	17,4	104	540	20,6a	2.408	2.341
AB202	17,2	104	524	19,2a	2.440	2.348

* Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 1%.

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

No ensaio em solo com histórico de fusarioses, não se constataram sintomas visíveis de podridão radicular ou morte súbita, na safra 2002/03. Nenhum dos parâmetros avaliados foi afetado significativamente pelos tratamentos, embora alguns isolados, como P07, P43 e LN1116, tenham aumentado a massa de raízes (Tabela 1.8).

O ensaio em solo com baixo P não foi conduzido na safra 2002/03, em função de restrições orçamentárias.

No inverno de 2003, as áreas experimentais foram cultivadas com trigo. Do mesmo modo que para a soja, sementes de trigo cv. BRS 208 foram inoculadas com inoculante turfoso dos isolados testados. Quando as plantas estavam em maturação fisiológica, avaliaram-se o rendi-

TABELA 1.8. Nodulação, desenvolvimento vegetativo e rendimento de grãos de plantas de soja cv. BRS 154 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Ponta Grossa, PR, em solo com histórico de fusariose, safra 2002/03.

Tratamento	Número de nódulos (nº/pl)	Massa nódulos secos (mg/pl)	Massa raízes secas (mg/pl)	Massa p. aérea seca (mg/pl)	Rendim. de grãos (kg/ha)
Testemunha	19,9 ^{NS}	61 ^{NS}	964 ^{NS}	5.311 ^{NS}	2.907 ^{NS}
P07	18,6	52	1.062	5.370	2.900
P22	20,4	57	937	4.815	2.860
P43	17,6	44	1.047	5.280	2.890
LN1116	19,0	47	1.100	5.437	2.681
LN3212	21,4	59	996	5.795	2.981
BA227	18,7	54	906	4.781	2.941

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

mento de grãos e o peso hectolítico dos mesmos. No ensaio em Londrina, alguns isolados aumentaram significativamente o rendimento de grãos em relação à testemunha, tendo-se destacado os isolados GN2214, LN3212 e P53 (Tabela 1.9); o aumento proporcionado pelo isolado GN2214 foi de 43%. Não houve influência significativa sobre o peso hectolítico.

Em Ponta Grossa, no ensaio sob condições normais, não houve efeito significativo dos tratamentos, embora o isolado LN3212 tenha aumentado o rendimento de grãos em 10% (Tabela 1.9).

No ensaio em solo com baixo P disponível, em Ponta Grossa, nenhum tratamento apresentou efeito significativo sobre o rendimento ou o peso hectolítico de grãos de trigo (Tabela 1.10). No entanto, os isolados P53, LN3212 e P21 aumentaram significativamente o teor de P nos grãos. O tratamento com o isolado AB202 foi perdido por ataque de lebre.

TABELA 1.9. Peso hectolítico e rendimento de grãos de plantas de trigo cv. BRS 208 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Londrina e Ponta Grossa (condições normais), PR, safra 2003.

Tratamento	Londrina		Ponta Grossa	
	Peso hectolítico (kg/hl)	Rendim. de grãos (kg/ha)	Peso hectolítico (kg/hl)	Rendim. de grãos (kg/ha)
Testemunha	69,4 ^{NS}	2.007c ^f	66,0 ^{NS}	3.373 ^{NS}
GN1201	69,6	2.169bc	66,3	3.410
GN2214	72,2	2.861a	66,8	3.284
P21	71,8	2.538ab	66,6	3.488
P53	69,9	2.609a	66,9	3.267
LN3212	70,6	2.674a	66,1	3.713
AB202	71,0	2.519ab	65,3	3.319

^f 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%.

Na área com histórico de fusariose, nenhum tratamento apresentou efeito significativo sobre o rendimento ou o peso hectolítico de grãos de trigo (Tabela 1.11). Chama a atenção o alto rendimento obtido nessa safra (média em torno de 4.600 kg ha⁻¹).

TABELA 1.10. Peso hectolítico, rendimento de grãos e teor de fósforo nos grãos de plantas de trigo cv. BRS 208 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Ponta Grossa, PR, em área com baixa disponibilidade de fósforo, safra 2003.

Tratamento	Peso hectolítico (kg/ha)	Rendim. de grãos (kg/ha)	Teor de P nos grãos (g/kg)
Testemunha	67,4 ^{NS}	1.002 ^{NS}	4,54b ^f
GN1201	65,8	585	5,21ab
GN2214	65,1	593	4,93ab
P21	66,5	792	5,47a
P53	66,3	730	5,58a
LN3212	66,9	825	5,56a
AB202	Parcelas perdidas	

^f 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%.

TABELA 1.11. Peso hectolítico e rendimento de grãos de plantas de trigo cv. BRS 208 inoculadas com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento em Ponta Grossa, PR, em solo com histórico de fusariose, safra 2003.

Tratamento	Peso hectolítico (kg/ha)	Rendimento de grãos (kg/ha)
Testemunha	68,5 ^{NS}	4.845 ^{NS}
P07	67,2	4.570
P22	68,4	4.444
P43	67,2	4.486
LN1116	68,0	4.639
LN3212	66,9	4.387
BA227	67,1	4.777

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



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 69% a 94% do N acumulado pelas plantas, representando fixação de 109 a 300 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 recomendadas. Entretanto, em lavouras comerciais, raramente a soja produz mais que 4000 kg/ha (66 sacos/ha). Sistematicamente, 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 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 nas 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.

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

Rubens José Campo; Mariangela Hungria; Leny M. Miura;
José Z. Moraes; Rubson N.R. Sibaldelle; Miguel Pereira de Souza;
Maria Cristina Neves de Oliveira

A reinoculação da soja proporciona o aumento da população da bactéria introduzida nas sementes da soja, favorecendo a competição com a naturalizada. Isso proporciona uma melhor nodulação primária da coroa do sistema radicular da soja e a melhor fixação biológica do nitrogênio (FBN) do ar do solo e o 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 uma maior população e sobrevivência das células nas sementes. Assim, o objetivo do trabalho consiste de: (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.

A recomendação atual de estirpes para os inoculantes de soja consiste em se utilizar duas das quatro estirpes, atualmente recomendadas: SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Sabe-se que aumentando o número de células de uma estirpe nas sementes aumenta-se a competição com a naturalizada, favorecendo a nodulação primária com a bactéria introduzida. Presume-se, então, que o uso de uma estirpe nos inoculantes, ao invés de duas, aumentará a eficiência do processo de FBN e o rendimento da soja. 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 (Tabela 2.1) e Ponta Grossa (Tabela 2.2) e em Taciba, SP, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* (Tabela 2.3). Em Londrina, o tratamento com N mineral apresentou melhor rendimento de grãos (3497 kg/ha) do que os demais tratamentos. Isso demonstra que houve deficiência de N da fixação para as plantas. Análises de solo e plantas serão avaliadas para identificar a causa da baixa eficiência da FBN nesse local. Essa hipótese se confirmou ao compararmos o tratamento sem inoculação com os demais inoculados quando nenhum dos tratamentos inoculados apresentou nodulação ou rendimento de grãos superiores ao tratamento testemunha sem inoculação. Em Ponta Grossa, assim como em Londrina, a aplicação de N mineral reduziu a número e a massa de nódulos. Com relação ao rendimento de grãos, por deficiência hídrica, todos os tratamentos apresentaram baixos rendimentos e não diferiram entre si.

TABELA 2.1. Efeito da reinoculação da soja, cv. BRS 133, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Londrina, PR, safra 2002/03, em solo LRD com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($1,1 \times 10^5$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nº nod/pl	MSN (mg.pl ⁻¹)	Rend. ³ (kg.ha ⁻¹)
1- Test. sem inoculação	12,7a ²	32,3a ²	3179ab ²
2- 200 kg N/ha ¹	9,7 b	14,3 b	3497 a
3- Semia 587	15,5a	36,4a	3293ab
4- Semia 5019	15,0a	37,7a	3219ab
5- Semia 5079	14,2a	34,5a	3113 b
6- Semia 5080	14,5a	36,5a	3111 b
7- Semia 587 + 5019	15,0a	36,5a	3142 b
8- Semia 5079 + 5080	14,5a	29,8a	3175ab
9- Semia 587 + 5080	12,8a	33,2a	3070 b
CV(%)	15,7	28,9	8,4

¹ N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

Os resultados preliminares da safra 2000/01, indicavam efeito positivo da reinoculação com a estirpe SEMIA 5079, nos dois locais. Na safra 2001/02, a combinação SEMIA 587 + SEMIA 5019, apresentou melhor desempenho que as demais. Nesta safra, em solos de população estabelecida, nenhum dos tratamentos inoculados apresentou resultados de rendimento superior à testemunha sem inoculação, pelos motivos expostos. Por outro lado, nos solos sem população estabelecida de Jaciara, MT e Lucas do Rio Verde, MT, safra de soja 2001/02, os resultados foram muitos prejudicados pelo excesso de chuva na colheita, mas os resultados de nodulação mostram que as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram melhor nodulação que as demais.

TABELA 2.2. Efeito da reinoculação da soja, cv. BRS 133, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Ponta Grossa, PR, safra 2002/03, em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($4,9 \times 10^4$ células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nº Nod.pl	MSN (mg.pl ⁻¹)	Rend. ³ (kg.ha ⁻¹)
1- Test. Sem Inoculação	19,20 c ²	47,7a ²	2638a ²
2- 200 kg N/ha ¹	8,30 d	13,2 b	2636a
3- Semia 587	26,90a	53,7a	2794a
4- Semia 5019	20,80 bc	52,0a	2736a
5- Semia 5079	24,30abc	52,5a	2670a
6- Semia 5080	22,80abc	54,3a	2730a
7- Semia 587 + 5019	25,46ab	55,8a	2759a
8- Semia 5079 + 5080	24,80ab	53,2a	2759a
9- Semia 587 + 5080	23,70abc	51,7a	2770a
CV(%)	19,6	24,4	7,8

¹ N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

Nessa safra, 2002/03, no solo sem população estabelecida, verificou-se que os tratamentos inoculados apresentaram resultados para número e massa de nódulos superiores aos tratamentos sem inoculação e com N mineral (Tabela 2.3). Dentre os tratamentos inoculados, as estípites SEMIA 587 e SEMIA 5019, de forma individual ou combinada apresentaram número e massa de nódulos superiores às estípites SEMIA 5079, SEMIA 5080 e a combinação entre elas, confirmando os resultados do ano anterior, mostrando que elas possuem maior capacidade de formar nódulos em áreas de primeiro ano de cultivo de soja. Por outro lado, as estípites SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e a combinação de ambas apresentaram, na média, 5% a mais de rendimento do que a média das

TABELA 2.3. Efeito da reinoculação da soja, cv. BRS 133, com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação e rendimento de grãos. Experimento conduzido em Taciba, PR, safra 2002/03, em solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($<1 \times 10^1$) células/g solo). Média de seis repetições. Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nº nod/pl		MSN (mg.pl ⁻¹)	Rend. ³ (kg.ha ⁻¹)
1- Test. Sem Inoculação	0,4	d ²	4,2 c ²	4054 b ²
2- 200 kg N/ha ¹	0,2	d	1,5 c	4365ab
3- Semia 587	32,1 a		111,7 a	4271 ab
4- Semia 5019	24,2 b		102,5 a	4306ab
5- Semia 5079	11,2 c		38,8 b	4510a
6- Semia 5080	8,6 c		52,5 b	4503a
7- Semia 587 + 5019	20,1 b		100,5 a	4274ab
8- Semia 5079 + 5080	9,3 c		38,8 b	4521 a
9- Semia 587 + 5080	30,1 a		125,1 a	4493a
CV (%)	11,5		27,6	6,3

¹ N aplicado 50% no plantio e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

estripes, SEMIA 587, SEMIA 5019 e a sua combinação. Os tratamentos inoculados apresentaram em média 8% a mais de rendimento em relação ao tratamento sem inoculação.

Anualmente, diversos inoculantes coletados no comércio vêm sendo acompanhadas quanto a sua qualidade. Nessa safra, tomou-se o cuidado de se coletar inoculantes em estabelecimentos comerciais em diversas regiões do país. Os inoculantes (Tabela 2.4) foram avaliados em estudos de laboratório e casa de vegetação, de acordo com metodologia estabelecida pela RELARE. Em condições de laboratório, foram avaliadas as populações de células em meio ágar manitol (AM) e meio seletivo (MS), e a ocorrência de contaminantes em meios BDA e ágar nutri-

TABELA 2.4. Número de células de *Bradyrhizobium* por g ou ml de inoculante obtidos em meios de cultura ágar manitol, meio seletivo e em plantas e número de contaminantes em BDA e ágar nutritivo de inoculantes coletados em estabelecimentos comerciais, safra de soja 2003/04. Embrapa Soja, 2004.

Inoculantes	Ágar manitol	Meio seletivo	NMP em planta	Nº Contam.
Noctin A - L	$3,51 \times 10^9$	$5,07 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	0,0
Gelfix - 300 ml	$1,32 \times 10^9$	$1,63 \times 10^9$	$4,27 \times 10^8$	0,0
Gelfix - 1,5 L	$2,50 \times 10^9$	$1,85 \times 10^9$	$9,32 \times 10^7$	0,0
Adhere 50	$1,43 \times 10^9$	$3,50 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	$> 1 \times 10^{10}$ (AN)
Biomax - 300 ml	$2,10 \times 10^9$	$1,52 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	$1,79 \times 10^9$ (AN)
Biomax - 1,8 L	$1,85 \times 10^6$	$6,94 \times 10^6$	$1,49 \times 10^6$	0,0
Biomax - T	$1,47 \times 10^9$	$1,24 \times 10^9$	$4,27 \times 10^8$	$1,33 \times 10^7$ (AN)
TSI - L	$3,51 \times 10^9$	$5,07 \times 10^9$	$4,27 \times 10^8$	0,0
Urulec L	$3,18 \times 10^9$	$3,38 \times 10^9$	$9,32 \times 10^7$	0,0
Urulec T	$3,34 \times 10^9$	$2,79 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	0,0
Cell Tech -L	$1,70 \times 10^9$	$1,13 \times 10^9$	$9,32 \times 10^7$	0,0
Rhizomax - L	$1,37 \times 10^9$	$1,54 \times 10^9$	$4,27 \times 10^8$	0,0
Masterfix - L	$1,85 \times 10^9$	$2,28 \times 10^9$	$2,39 \times 10^8$	0,0
Masterfix - T	$4,39 \times 10^9$	$4,96 \times 10^9$	$1,49 \times 10^8$	0,0
Biagro - T	$4,58 \times 10^9$	$6,48 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	0,0
Rizoliq - L	$4,22 \times 10^9$	$4,96 \times 10^9$	$9,32 \times 10^8$	0,0

Onde: L (líquido); T (turfa); NA (ágar nutritivo)

tivo (NA). Em casa de vegetação as populações de células por método de diluição em plantas (NMP). À exceção do inoculante Biomax líquido, embalagem 1,8 litros, todos os inoculantes testados (Tabela 2.4) apresentaram populações de células nos meios AM e MS superiores ao mínimo 1×10^9 células por ml ou g de produto. Nas safras anteriores, diversos inoculantes turfosos apresentaram níveis de contaminantes fora dos padrões mínimos de qualidade, demonstrando que os processos de esterilização de turfas ainda precisam ser melhorados. Nesta

safra, somente os inoculantes Adhere 50, Biomax L, embalagem 300 ml, e Biomax turfa, apresentaram contaminantes em meio AN superiores ao padrão.

Nos dois anos anteriores, 19 testes de eficiência agronômica foram realizados. Na safra 2002/2003, somente dois inoculantes líquidos, Noctin e Masterfix, foram submetidos aos testes de eficiência agronômica a campo. Os trabalhos foram efetuados em Londrina, solo de população estabelecida, Taciba solos de 1º e 2º anos de plantio de soja. Nos locais de população estabelecida os inoculantes testes foram iguais ao padrão turfoso 600 000 células/semente. No solo de primeiro ano de plantio, a nodulação e o rendimento do inoculante padrão foi superior aos inoculantes testes.

Para avaliação do terceiro objetivo do projeto, dois tipos de estudos foram realizados. O primeiro consistiu de se comparar o método atual de inoculação, aplicação de inoculante turfoso na dose de 300 000 células/semente, com diversas populações de células de *Bradyrhizobium*. Esse experimento foi realizado em solos com população estabelecida de Londrina (Tabela 2.5) e Taciba, SP, área de segundo ano de soja (Tabela 2.6) e, Taciba em área de primeiro ano de plantio, sem população estabelecida (Tabela 2.7). Na área de população estabelecida (Tabela 2.5) a massa e o número de nódulos foi reduzida pelo N mineral. Os demais tratamentos não diferiram entre si. Com relação ao rendimento e N total nos grãos, novamente os resultados ficaram mascarados devido a fatores que inibem a eficiência da FBN, embora os tratamentos sem inoculação e inoculados com mais de 600 000 células por semente apresentaram rendimentos superiores à testemunha 200 kg/N/ha. No solo de segundo ano de plantio de soja em Taciba, o tratamento que apresentou maior nodulação, massa de nódulos, N nos grãos e rendimento de grãos foi com 1200 000 células por semente. No solo sem população estabelecida, (Tabela 2.7), novamente, o tratamento com 1200 000 células/semente apresentou a melhor nodulação, FBN e o melhor rendimento de grãos. Esses resultados confirmam os resultados de safras anteriores demonstrando que são necessários no mínimo 600 000 células/semente para obtenção de altas taxas de FBN, embo-

TABELA 2.5. Efeito do número de células de *Bradyrhizobium* no número de nódulos por planta (Nº nod/pl.) e massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), N total nos grãos e rendimento de grãos de soja. Londrina safra 2002/03, média de 6 repetições, Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nodulação		Grãos	
	Nº nod/pl	MSN/ mg.pl ⁻¹	N kg/ha	kg/ha ³
1- Sem inoculação	8a ²	9a ²	199ab ²	3459ab ²
2- IP + 200 kg N ¹	4 b	3 b	186 b	3244ab
3- IP com 300 000 células	10a	8a	182 b	3082 b
4- IP com 600 000 células	9a	9a	200ab	3410ab
5- IP com 1200 000 células	10a	12a	208a	3541a
CV (%)	58,2	38,2	8,3	6,2

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

ra o ideal seja aplicar 1200 000 células/semente, indicando que a recomendação técnica de 300 000 células/semente necessita ser alterada. O outro estudo consistiu da comparação do método de inoculação atual, aplicação de inoculante turfose nas sementes com e sem fungicidas e micronutrientes com a aplicação de doses de inoculante líquido no sulco de semeadura. Os resultados obtidos na safra 2001/02 mostraram que é possível substituir a aplicação de inoculantes nas sementes pela aplicação no sulco, desde que se utilizem maior número de células no sulco de semeadura. Na safra 2002/2003 foram instalados três experimentos para esses estudos. Em Londrina, solo com população estabelecida, verificou-se que foram necessários 1200 ml do inoculante líquido Bioarts (5,3 vezes a utilizada nas sementes) para se obter resultados de nodulação e rendimento igual ao padrão turfose com sementes sem o tratamento com fungicida e micronutrientes (Tabela 2.8).

TABELA 2.6. Efeito do número de células de *Bradyrhizobium* no número de nódulos por planta (N nod/pl.) e massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), N total nos grãos e Rendimento de grãos de soja obtidos em solo de Taciba, SP, de segundo ano de plantio de soja. Taciba, safra 2002/03, média de 6 repetições, Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nodulação		Grãos	
	Nº nod/pl	MSN/ mg.pl ⁻¹	N kg/ha	kg/ha ³
1- Sem inoculação	40 b ²	70ab ²	245a ²	4254a ²
2- IP + 200 kg N ¹	49ab	58 b	252a	4321a
3- IP com 300 000 células	50ab	82a	249a	4282a
4- IP com 600 000 células	50ab	84a	252a	4353a
5- IP c/ 1200 000 células	55a	89a	260a	4507a
CV (%)	17,1	24,2	7,2	6,3

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

Em Londrina, com o inoculante Cell Tech, comparou-se os métodos de inoculação, nas sementes e no sulco (5,3 vezes a dose da semente). Os resultados não mostraram diferenças estatísticas entre a inoculação nas sementes ou não na presença ou não de fungicidas (Tabela 2.9). Por outro lado, em Taciba, safra 2002/03, solo sem população estabelecida, verificou-se que os melhores resultados de nodulação e rendimento de grãos ocorreu com a aplicação de 5,3 doses de inoculante no sulco semeadura (Tabela 2.10), embora possa não ser o mais econômico.

Os resultados obtidos pelo subprojeto permitiram a obtenção de duas novas tecnologias para os agricultores bem como a recomendação de dois inoculantes líquidos, que tinham restrição de utilização pelos agricultores. Das metas previstas (4) somente uma delas, utilização de apenas uma estirpe de *Bradyrhizobium* nos inoculantes ainda não está

TABELA 2.7. Efeito do número de células de *Bradyrhizobium* no número de nódulos por planta (NN pl.) e massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), N total nos grãos e rendimento de grãos de soja obtidos em solo de primeiro ano de plantio de soja. Taciba, SP, safra 2002/03, média de 6 repetições, Embrapa Soja, 2003.

Tratamentos	Nodulação				Grãos			
	30 dias após plantio		Floração		N kg/ha	Rend. ³ kg/ha		
	nº/pl	mg/pl	nº/pl	mg/pl				
1- Sem inoculação	1 c ²	7 e ²	2 c	30 d ²	241 c ²	4190 c ²		
2- IP + 200 kg N ¹	8 b	25 d	12 b	56 c	285 ab	4545 abc		
3- IP com 300 000 células	7 b	37 c	10 b	73 c	258 bc	4361 bc		
4- IP com 600 000 células	8 b	52 b	16 b	126 b	280 ab	4578 ab		
5- IP c/ 1200 000 células	26 a	113 a	45 a	233 a	305 a	4861 a		
CV (%)	16,4	17,5	30,6	11,3	8,4	7,8		

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 2.8. Efeito da aplicação do inoculante líquido Bioarts poraspersão manual no sulco de semeadura com o uso de sementes de soja tratadas com fungicidas e micronutrientes (TSI) 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, safra 2002/03. Média de seis repetições. Embrapa Soja 2003.

Tratamentos	Nº nod./pl	MSN mg.pl^{-1}	Rend. ¹ kg.ha^{-1}
1. Sem inoculação	26,0	88,5	2341
2. IP	22,5	88,3	2495
3. TSI + IP	24,3	90,0	2458
4. 600ml I. liq. + TSI	21,8	77,3	2448
5. 1200ml I. lig. + TSI	25,0	93,5	2542
CV (%)	18,2	20,1	10,4

¹ Rendimentos corrigidos para 13% de umidade.

definida. Espera-se com esta última safra atingir esta meta e se possível, conseguir oferecer outros novos inoculantes aos agricultores que a cada ano acreditam mais na FBN e procuram melhores inoculantes. Os resultados desse estudo permitiram ao todo a publicação de 68 trabalhos e a apresentação de 91 trabalhos, em congressos ou em palestras. Os resultados do projeto permitiram gerar cinco novas tecnologias como a melhoria da qualidade dos inoculantes, novos produtos e novas técnicas de inoculação. A boa divulgação dos resultados nos meios de comunicação permitiram aumentos sucessivos de utilização de inoculantes pelos produtores de soja. Por exemplo, na safra 2002/03 foram comercializadas 18 milhões de doses de inoculante, na safra 2003/04, 25,7 milhões de doses de inoculante para soja no Brasil.

Os resultados deste ano, somados aos anos anteriores permitiram a geração de mais duas novas tecnologias a serem incorporadas às recomendações técnicas para a cultura da soja.

TABELA 2.9. Efeito do inoculante líquido Cell Tech no número de nódulos por planta (Nº/pl.), na massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), no N na massa seca da planta (N mg.pl⁻¹), nos teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹), no N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e no rendimento de grãos (kg.ha⁻¹). Experimento conduzido em Londrina (PR), solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, safra 2002/03. Média de cinco repetições. Londrina, PR, 2003.

Tratamentos	Nº nod./pl	MSN mg.pl ⁻¹	N msp mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
Sem inoculação	13,1 ²	26,3	98 b ²	168	2841
200 kg N ¹	10,6	16,2	148ab	156	2652
I Cell Tech	16,5	44,2	170a	181	3080
fungicida + I Cell Tech	14,1	24,4	116 b	192	3113
Cell Tech sulco	17,6	35,1	114 b	191	3029
fungicida + Cell Tech sulco	15,5	33,2	109 b	184	3003
CV (%)	28,8	53,5	23,3	12,0	11,8

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

² 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;

³ rendimentos corrigidos para 13% de umidade.

TABELA 2.10. Efeito do inoculante líquido Cell Tech no número de nódulos por planta (Nº/pl.), na massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), no N na massa seca da planta (N msp a mg.pl⁻¹), nos teores de N nos grãos (N mg.g⁻¹), no N total nos grãos (N kg.ha⁻¹) e no rendimento de grãos (kg.ha⁻¹). Experimento conduzido em Taciba, PR, solo sem população estabelecida *Bradyrhizobium*, safra 2002/03. Média de seis repetições. Londrina, PR, 2003.

Tratamentos	Nºnod. /pl ²	MSN mg.pl ⁻¹	N msp a mg.pl ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend. ³ kg.ha ⁻¹
Sem inoculação	0,2 c ²	1,7 c	125	205 bc	3560 bc
200 kg N ¹	0,1 c	0,3 c	158	199 c	3296 c
I Cell Tech	14,1 b	60,9 b	100	232abc	3985ab
I Cell Tech + fungicida	0,2 c	1,6 c	121	225abc	3870ab
Cell Tech sulco	26,0a	118,8a	149	250a	4244a
fungicida + Cell Tech sulco	19,2 b	79,7 b	109	240ab	4036ab
CV (%)	51,5	48,3	34,1	10,8	9,6

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

² 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;

³ rendimentos corrigidos para 13% de umidade.

(a) Inoculação com inoculante líquido no sulco de semeadura – Essa é uma nova tecnologia que os produtores poderão utilizar na safra que se aproxima. Método alternativo de inoculação, aplicação do inoculante por aspersão no sulco de semeadura, por ocasião da semeadura. Esse método pode ser utilizado em solos com ou sem população de *Bradyrhizobium* estabelecida. A desvantagem do método é que a dose de inoculante a ser utilizada deve ser, no mínimo, seis vezes superior à dose indicada para as sementes, além do custo inicial de adaptação da semeadora, estimado em R\$ 2 500,00. O volume de líquido (inoculante mais água) usado nos experimentos não foi inferior a 50 l/ha. Por outro lado, esse método tem a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos do tratamento de sementes com fungicidas e da aplicação dos micronutrientes cobalto (Co) e molibdênio (Mo) nas sementes sobre a bactéria. (b) Qualidade e quantidade dos inoculantes – A recomendação técnica de inoculação das sementes consistia em aplicar a quantidade mínima de inoculante suficiente para fornecer 300.000 bactérias/semente. A recomendação técnica de inoculação atual passa a recomendar a quantidade mínima de inoculante que forneça 600.000 bactérias/semente. Entretanto, os resultados de pesquisa indicam benefícios crescentes à nodulação e à FBN pela utilização de 1.200.000 bactérias/semente. A base de cálculo do número de bactérias/semente é a concentração registrada no MAPA constante na embalagem.



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

Rubens José Campo; Mariangela Hungria; Everson Laureto¹;
Leni Mieko Miura; Rubson Natal R. Sibaldelli; José Zeca Morais;
Miguel Pereira de Souza; Maria Cristina Neves de Oliveira

¹ Estagiário da UNOPAR

2.1.1 Resumo

O cultivo sucessivo da soja e a sua expansão para diversas regiões do Brasil implica em maior uso de fungicidas, inseticidas e micronutrientes nas sementes da soja junto com a inoculação. Por outro lado, sucessivos 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 da fixação biológica do N atmosférico (N_2) por simbiose, consequentemente, 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 (*Bradyrhizobium*) na semente, através da inoculação, aumenta 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 nas sementes, logo após os fungicidas, os micronutrientes Co e Mo e os inseticidas. Isso tem causado uma redução do número de células nas sementes, que pode estar causando redução na nodulação, na FBN e no rendimento da soja. 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 destes produtos de forma que não reduzam a população da bactéria nas sementes e, por consequência, 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.

2.1.2 Micronutrientes

Os resultados obtidos nas safras 2000/01 e 2001/02 mostraram que o Mo é indispensável para a FBN, entretanto, sua aplicação nas sementes

tes, embora seja uma prática mais simples, provoca substanciais reduções na nodulação, muitas vezes comprometendo os rendimentos de soja. Por ser o Mo um nutriente de fácil translocação e absorção pela planta, as alternativas como aplicações foliares do Mo antes do início da floração e ou o uso de sementes enriquecidas em Mo demonstraram, em algumas situações, serem mais eficazes que a aplicação nas sementes. Por outro lado, para o Co, nutriente de menor translocação na planta, as informações sobre os seus efeitos sobre a bactéria e sua eficiência quando aplicado nas folhas são ainda insipientes, merecendo maior atenção. As principais fonte de Co disponíveis são o cloreto de Co e o sulfato de Co. Essas fontes de Co foram avaliadas quanto ao seus efeitos sobre a sobrevivência do *Bradyrhizobium*, medidos pela nodulação e eficiência de FBN. Na safra 2001/02 verificou-se que em solo sem população estabelecida da bactéria, as duas fontes de Co, sulfato e cloreto, reduziram a nodulação quando aplicados nas sementes e não reduziram quando aplicados via foliar. Resultados anteriores, em solo de população estabelecida de Londrina, mostraram que somente o cloreto de Co aplicado foliar apresentou efeito positivo sobre o rendimento de grãos. Nesta safra, 2002/03 (Tabela 2.11), verificou-se em solos sem população estabelecida de Taciba, SP, que todos os tratamentos em que foi aplicado o Co houve redução da nodulação e o melhor rendimento foi obtido com o cloreto de Co. Em Londrina, solo com população estabelecida, o melhor rendimento foi obtido com a fonte sulfato de Co aplicado nas sementes. Os resultados foram inconsistentes nessa duas safras e, por isso, eles serão repetidos.

2.1.3 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, Difenoconazole + Thiram, 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 ao

TABELA 2.11. Efeito da aplicação de 2,5 g de Co na semente e nas folhas sobre o número de nódulos (Nº N), massa seca de nódulos (mg/pl) e o rendimento de grãos de soja (kg/ha) em dois tipos de solo, Londrina, PR, com população estabelecida e Taciba, SP, sem população estabelecida. Londrina, PR. Embrapa Soja, 2003.

Tratamento	Londrina			Taciba		
	NºN	Massa	kg/ha ²	Nº N	Massa	kg/ha ²
1- IP ¹ + Sem Co	10,5	22,5	3391	12,6a	71,7a	4390ab
2- IP + Co semente (cloreto)	11,2	27,5	3314	4,5 bc	34,7 bc	4539a
3- IP + Co semente (sulfato)	10,0	20,2	3558	5,5 bc	48,1 bc	4410ab
4- IP + Co foliar (cloreto)	10,3	23,0	3304	6,8 b	43,7 bc	4503ab
5- IP + Co foliar (sulfato)	11,0	20,3	3337	3,8 c	29,7 c	4352ab
6- IP + trat. 2 + trat. 4	10,3	27,5	3281	4,3 bc	52,0 b	4219 b
CV (%)	28,9	28,5	5,4	36,0	35,3	4,9

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 $1,9 \times 10^9$ células/g de inoculante;

² rendimento corrigido para 13% de umidade.

plantio, embora a recomendação de fungicidas seja contato + sistêmico, por ocasião do plantio. Por isso o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos, em conjunto e isoladamente e, quando aplicados em conjunto 15 dias antes do plantio, na nodulação, no potencial de FBN e na emergência das plântulas a campo. Nas safras anteriores verificou-se que, com algumas exceções, alguns tratamentos com fungicida não afetaram a massa de nódulos e o rendimento de grãos, mas sempre afetaram o número de nódulos em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Em solos com população estabelecida essa freqüência de efeitos negativos dos fungicidas sobre a FBN é menos drástica. Por outro lado, tem-se verificado, em ambos tipos de solo, que raramente há um efeito positivo dos fungicidas sobre a emergência de plantas a campo. Nesta safra, algumas combinações de fungicidas foram novamente avaliadas em solo sem população estabelecida de Taciba, SP. Os resultados mostram (Tabela 2.12) que todos os fungicidas reduziram o número e a massa de nódulos, mesmo quando o tratamento de sementes foi feito 15 dias antes da inoculação e plantio. Os melhores rendimentos foram obtidos com os tratamentos testemunhas com 200 kg de N e inoculação sem fungicida, os quais não diferiram dos tratamentos com aplicação dos fungicidas Fludioxil + Metalaxyl-M mais inoculação padrão e do tratamento quatro, tratado com fungicida 15 dias antes da inoculação. Novamente, não se constataram efeitos positivos dos fungicidas na emergência a campo, confirmando que, na ausência de condições favoráveis aos fitopatógenos, o tratamento de sementes com fungicidas pode ser dispensado, evitando efeitos negativos sobre a FBN.

2.1.4 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 estádio vegetativo a planta é totalmente destruída. Assim, além do controle químico e do manejo integrado com rotação

TABELA 2.12. Efeito da aplicação de fungicidas no número de nódulos por planta (Nº N), massa de nódulos secos (MSN mg.pl⁻¹), peso de 100 sementes (g), emergência a campo e rendimento de grãos (kg/ha) em solos de primeiro ano de cultivo de soja de Taciba, SP, safra 2002/03. Média de seis repetições. Embrapa Soja 2003.

Tratamento	Nº Nod.	MSN mg/pl	Peso 100 S	Emer. (%)	Rend. kg/ha ⁴
1. Sem Inoc	0,4	e ³	2,6 d	17,8 c	72 4070 c
2. IP + 200 kg N (100 + 100) ¹	4,9 b		13,9 b	19,8a	71 4484ab
3. IP ²	14,5a		85,5a	19,7a	67 4476ab
4. IP + Carboxin + Thiram	1,1	de	6,5 c	18,5 bc	69 4064 c
5. IP + Thiabendazole + Tolyfluanid	0,3	e	2,3 d	17,7 c	67 4109 c
6. IP + Carbedazin + Thiram	0,4	e	3,3 cd	18,3 bc	73 4000 c
7. IP + Carbedazin + Captan	0,5	e	2,9 cd	17,9 bc	70 4078 c
8. IP + Difeconazole + Thiram	0,6	e	7,0 c	18,7 b	71 4217 bc
9. IP + Fludioxil + Metalaxyl-M	2,8	c	14,0 b	19,7a	73 4583a
10. Trat 4 + 15 dias antes	2,3	cd	16,0 b	19,5a	73 4454ab
CV %	24,1		25,1	3,6	4,3 ns 5,9

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo método de Duncan;

⁴ rendimento corrigido para 13% de umidade.

de culturas para controle do inseto, o tratamento de sementes com inseticidas passou a ser usado pelos agricultores com bastante sucesso, entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos que esses produtos possam estar causando na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da aplicação conjunta de inseticidas e inoculante na FBN com a cultura da soja. Por dois anos consecutivos avaliou-se, em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*, o efeito dos inseticidas Standak, Cruiser e Gaucho, aplicados nas sementes de soja na dose recomendada juntamente com o inoculante. Os inseticidas não afetaram a FBN, por isso esses estudos foram dados como concluídos. Nova demanda de estudos apareceu após isso, de informações sobre efeito de inseticidas aplicados juntamente com inoculantes no sulco de semeadura. Esses estudos vão ser realizados na próxima safra.

2.1.5 Interação inoculante, micronutriente, fungicida e inseticida

Os resultados anteriores mostraram que quanto mais produtos se aplicam nas sementes maiores são os efeitos negativos destes sobre a FBN. De acordo com os resultados apresentados, à medida que se adicionam mais produtos nas sementes ocorrem maiores reduções na nodulação, mesmo quando os micronutrientes são aplicados via foliar aos 30 DAE. Isso mostra que a aplicação de fungicidas mais inseticidas, junto com o inoculante, deve ser evitada.

2.1.6 Efeito da aplicação de calcário, incorporado ou não, junto com a *Brachiaria*

Esses estudos tiveram início nesta safra, 2002/03, em função de várias consultas de produtores de soja e técnicos da assistência técnica. A afirmação era de que diversas lavouras de soja que estavam sendo implantadas em áreas de pastagem degradada com *Brachiaria* não estavam formando nódulos, apesar de inoculadas. A hipótese levantada por muitos era de que a *Brachiaria* apresentava efeitos

alelopáticos e impediam a nodulação. Não encontramos na literatura nada que confirmasse ou contestasse a hipótese levantada. Optamos por testar três fatores que pudessem estar impedindo essa nodulação. O primeiro foi testar dessecação sem incorporação e a incorporação da *Brachiaria*. O outro estudo consistiu de estudar o efeito da calagem, na presença de Al e deficiência de Ca e Mg, e o terceiro de avaliar se a falta de nodulação se devia aos inoculantes. Os experimentos foram instalados em Taciba, SP, em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Na Tabela 2.13 estão os resultados de nodulação aos 30 dias e floração e rendimento de grãos de soja obtidos após incorporação da *Brachiaria* e de 3,5 toneladas de calcário/ha (Tabela 2.13). Os resultados mostraram que a nodulação primária foi maior nas maiores doses de inoculante, o que descartou ser o efeito da incorporação da *Brachiaria* que prejudica a nodulação. Na floração, somente o tratamento sem inoculação apresentou baixo número de nódulos, resultando em baixo rendimento de grãos. O segundo estudo consistiu da aplicação de três toneladas de calcário na superfície e 500 kg na linha. Nesse caso, a *Brachiaria* foi somente dessecada, permanecendo na superfície (Tabela 2.14). Os resultados de nodulação aos 30 dias mostraram altos números de nódulos em todos os tratamentos inoculados, comprovando que o bom suprimento de Ca e Mg, sem a presença de Al no ambiente radicular favorece a nodulação. Com apenas 300 000 células/semente a nodulação foi abundante. Até mesmo no tratamento com N mineral o número de nódulos foi alto. O N mineral afetou, principalmente, a massa de nódulos. Na floração todos os tratamentos inoculados apresentaram acima de 62 nódulos/planta e massa de nódulos acima de 211 mg/planta, exceção para o tratamento sem inoculação com 108 mg/planta e IP + N, com 187 mg/planta. Os rendimentos de grãos foram similares para todos os tratamentos, provavelmente porque outros nutrientes limitaram essa diferenciação, uma vez que o sistema radicular ficou mais concentrado na superfície do solo, região influenciada pelo calcário.

TABELA 2.13. Efeito da aplicação de calcareo, por incorporação e da população de células sobre a o número (Nº) e massa de nódulos secos (mg/pl), aos 30 dias e na floração, e o rendimento da soja (kg/ha) em solo de primeiro ano de plantio de soja de Taciba, SP. Safra 2002/03, Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

Tratamentos	Aos 30 dias				Floração		Rend. kg/ha ⁴
	Nº	mg/pl	Nº	mg/pl			
Sem inoculação	1	c ³	11	d	5	d	3626 b
IP + 200 kg de N ¹	8	b	14	cd	29	b	3942ab
IP ² com 300 000 células	9	b	26	bc	21	c	3989ab
IP com 1 200 000 células	19a		61a		37a		4010ab
I turfoso (T) dose dupla	11	b	30	b	31ab	187 b	4161a
I líquido (L) dose dupla	11	b	48a		30	b	4010ab
I com L dose dupla + T dose dupla	18a		58a		31ab	193 b	4018ab
CV (%)	28,4		36,8		19,8	18,0	11,0

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo método de Duncan;

⁴ rendimento corrigido para 13% de umidade.

TABELA 2.14. Efeito da aplicação de calcareo na superfície e da população de células sobre o número e massa de nódulos secos (mg/pl) e do rendimento da soja em solo de primeiro ano de plantio de soja de Taciba, SP. Safra 2002/03, Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

Tratamentos	Aos 30 dias		Floração		Rend. kg/ha ⁴
	Nº	mg/pl	Nº	mg/pl	
Sem inoculação	2 c ³	11 d	37 b	148	3529 bc
IP + 200 kg de N ¹	27 b	56 c	66 a	187	4252 a
IP ² com 300 000 células	29 ab	73 bc	63 a	211	3420 c
IP com 1 200 000 células	34 a	95 a	73 a	245	4047 ab
I turfoso (T) dose dupla	29 ab	66 bc	62 a	226	3871 abc
I líquido (L) dose dupla	27 b	83 ab	62 a	267	3739 abc
I com L dose dupla + T dose dupla	35 a	101 a	77 a	292	3806 abc
CV (%)	22,5	9,9	25,7	29,1	10,8

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo método de Duncan;

⁴ rendimento corrigido para 13% de umidade.

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

Dando prosseguimento aos estudos anteriores, as cultivares de soja BRS 37 e BRS 133, enriquecidas ou não com Mo, foram avaliadas para determinar a necessidade adicional de aplicação de Mo (20 g Mo/ha) nas sementes ou foliar. As cultivares foram avaliadas a campo com os tratamentos sem adição de Mo e com aplicação de 200 kg de N/ha. O Co foi aplicado via foliar na dose de 2,5 g/ha, em todos os tratamentos. De modo geral, a aplicação adicional de Mo, via semente ou foliar ou, até mesmo o teor de Mo nas sementes não resultou em ganhos adicionais de rendimento. Os melhores rendimentos foram obtidos com o tratamento testemunha com N nas duas cultivares (Tabela 2.15). Isso comprova que algum fator, que não o Mo, impediu a eficiência da FBN. Estudos adicionais serão necessários nesse local para determinar o fator ou os fatores que estão inibindo altas taxas de FBN.

2.1.8 Tecnologias geradas

Os resultados desta safra, somados aos obtidos na safra anterior permitiram a geração de novas tecnologias que serão incorporadas às recomendações técnicas para a cultura da soja. (a) Compatibilidade de micronutrientes disponíveis no mercado em relação às estirpes comerciais de *Bradyrhizobium*. Os resultados em dois locais demonstraram que os produtos comerciais contendo Mo e Co com menor incompatibilidade com os tratamentos de sementes foram: CoMofix, Biocrop e Comosol BR4. (b) quanto à aplicação de inseticidas nas sementes de soja junto com o inoculante, verificou-se que os inseticidas Standak, Gaucho e Cruiser, quando aplicados nas sementes não reduzem a nodulação e a eficiência de fixação biológica da soja. (c) Enriquecimento de sementes com molibdênio – recomendação para produtores de sementes de soja. Fazer duas aplicações de 400 g de Mo, utilizando-se uma fonte solúvel em água, entre os estádios reprodutivos R3 e R5-4, com intervalo de, no mínimo, 10 dias. Essa prática deve ser executada exclusivamente pelos produtores de semente. Sementes

TABELA 2.15. Efeito do uso de sementes ricas em Mo e de aplicações complementares de Mo, no rendimento de grãos de soja, cv BR 37 e BRS 133. Londrina Embrapa Soja, 2003.

Tratamento	BR 37 ³			BRS 133 ⁴		
	P	R	Média	P	R	Média
1. IP ¹	3260	3200	3230 b	3177	3173	3175 c
2. IP + 200 kg N ²	3650	3736	3693a	3720	3439	3579a
3. IP + Mo, semente (20g)	3336	3364	3365 b	3284	3395	3339 bc
4. IP + Mo, foliar (20g) em V4	3291	3435	3364 b	3306	3262	3283 bc
5. IP + 3 + 4	3259	3283	3271 b	3380	3302	3341 bc
6. IP + 3 + 4 (50% da dose)	3324	3241	3283 b	3302	3416	3359 bc
7. IP + 10 g Mo em V4	3260	3262	3262 b	3224	3244	3234 bc
8. IP + 10 g de Mo em V4 e R3	3412	3326	3369 b	3364	3372	3368 b
Média			3355			3335
CV			5,8			3,9

¹ N aplicado como uréia, sendo 50% no plantio e 50% aos 30 dias após emergência;

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

³ sementes de soja BR 37 com 0,1 µg Mo/g semente (P) e com 33 µg Mo/g semente (R);

⁴ sementes de soja BRS 133 com 0,1µg Mo/g semente (P) e com 26 µg Mo/g semente (R).

enriquecidas com Mo não devem ser utilizadas na alimentação animal.

(d) Utilização de sementes enriquecidas em Mo por sojicultores em geral: a utilização de sementes enriquecidas em Mo aumenta a eficiência da FBN, aumentando os rendimentos da soja em 6 a 12%. Essa nova tecnologia não dispensa a aplicação do Co e Mo, nas sementes ou via pulverização foliar, antes da floração. (e) Aplicação de micronutrientes nas sementes: os micronutrientes Co e o Mo são indispensáveis para a eficiência da FBN, para a maioria dos solos onde a soja vem sendo cultivada. As indicações técnicas atuais destes nutrientes são para aplicação de 2 a 3 g de Co e 12 a 30 g de Mo/ha. Contudo, a aplicação de Co e Mo nas sementes reduz a sobrevivência do *Bradyrhizobium* e, consequentemente, a nodulação e a FBN. Nesse caso, a aplicação de Co e Mo, nas mesmas doses recomendada via sementes, poderá ser efetuada, em pulverização foliar, entre os estádios V3 – V5. (f) Aplicação de Co na semente juntamente com o inoculante e foliar: resultados preliminares indicam que as fontes de Co, sulfato de Co e cloreto de Co, aplicadas nas sementes reduzem a nodulação, o mesmo não ocorrendo quando aplicadas por pulverização foliar. (g) Eficiência da aplicação de Mo via foliar e nas sementes. Os resultados médios das 15 fontes de Mo testadas via aplicação foliar e nas sementes mostrou que a aplicação de Mo via foliar, antes da floração, foi mais eficaz do que a aplicação nas sementes, por apresentar maior rendimento. (h) Aplicação de fungicidas e micronutrientes nas sementes junto com o inoculante: a aplicação dos micronutrientes juntamente com os fungicidas, antes da inoculação, reduz o número de nódulos e a eficiência da FBN. Assim, quando for necessária a aplicação de fungicidas, deve-se aplicar o Co, 2 a 3 g/ha e o Mo 12 a 30g/ha, por pulverização foliar entre os estádios vegetativos, V3 - V5.



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

No. do Projeto: 06.02.01.327

Líder: Mariangela Hungria

Número de subprojetos que compõem o projeto: 04

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja; FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária); IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná)

Parceiros indiretos: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); UFPR (Universidade Federal do Paraná, Depto. de Bioquímica e Depto. de Genética); UEL (Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Microbiologia); Unifil (Centro Universitário Filadélfia); UFMT/FCAV (Universidade Federal do Mato Grosso, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias); UDESC (Universidade Estadual de Santa Catarina)

Mariangela Hungria; Rubens José Campo; Ligia Maria O. Chueire;
Eliane V. Bangel¹; Arnaldo Colozzi-Filho²; Luciana Grange³; Glaciela Kaschuk⁴;
Maria de Fátima Loureiro⁵

Este projeto foi conduzido no período de 2001 a 2003, sendo apresentado aqui um resumo dos principais resultados. Diversas bactérias diazotróficas conseguem se associar a algumas leguminosas

¹ FEPAGRO

² IAPAR

³ Aluna de doutorado em Genética da UFPR-Departamento de Genética

⁴ Aluna de mestrado em Microbiologia da UEL

⁵ UFMT

simbioticamente, estabelecendo o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e suprindo as necessidades de nitrogênio (N) destas plantas. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), por sua vez, se associam às raízes de diversas espécies de plantas, resultando em aumento na absorção de diversos nutrientes e reduzindo a suscetibilidade a doenças e estresses hídricos. Para garantir a maximização da contribuição da FBN e a contribuição dos FMA, 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 desenvolveu trabalhos relacionados ao uso de marcadores moleculares, visando maximizar a contribuição dos processos biológicos.

No primeiro subprojeto, de caracterização da “Coleção Nacional de Culturas de Rizóbio SEMIA”, do Centro de Pesquisa de Fixação Biológica do Nitrogênio, coordenado pela FEPAGRO, RS, foram avaliadas 138 estirpes recomendadas para o uso em inoculantes para leguminosas de grãos, forrageiras e leguminosas para adubação verde. Estão sendo utilizadas três metodologias para a caracterização genética das estirpes: 1) amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”, reação em cadeia de polimerase) com os oligonucleotídeos REP, ERIC e BOX, chamados coletivamente rep-PCR, que codificam seqüências repetitivas e conservadas do DNA, normalmente no espaço intergênico; 2) pela técnica de PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo de restrição por tamanho de fragmento), consistindo da amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, com o corte do fragmento obtido com três enzimas de restrição; e 3) seqüenciamento do fragmento do DNA que codifica o gene ribossomal 16S rRNA. Pela técnica de rep-PCR foi possível obter perfis diferenciados para as estirpes, inclusive com similaridade total de perfis entre algumas estirpes. Não foi possível, porém, estabelecer relações filogenéticas, que deverão ser traçadas com as demais análises. As análises por RFLP-PCR estão produzindo perfis distintos, o que vem sendo confirmado pelo seqüenciamento. As estirpes da coleção estão sendo classificadas em gêneros e espécies.

O segundo subprojeto, de caracterização da diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro, em solos brasileiros e seleção de estirpes mais eficientes e competitivas é coordenado pela Embrapa Soja. Inicialmente, foram caracterizados 243 isolados provenientes de 12 solos de dois ecossistemas contrastantes: Pernambuco, com solos neutros e clima semi-árido e Paraná, com solos ácidos e clima subtropical. Foi detectada uma grande diversidade genética, com 81% dos isolados apresentando perfis únicos de ERIC-PCR. O seqüenciamento da região 16S rDNA identificou espécies pertencentes a três gêneros, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, com uma predominância de *Rhizobium etli*. Além disso, há indicações de novas espécies de rizóbios. Também foram conduzidos seis ensaios de campo, em Londrina e Ponta Grossa, PR, em solos com população elevada de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro. A inoculação com estirpes selecionadas de *R. tropici* resultou em incrementos no número de células no solo e na ocupação dos nódulos e aumentos posteriores foram conseguidos pela reinoculação com as mesmas estirpes. Considerando a média dos seis ensaios, as estirpes H 12 e H 20 resultaram em incrementos no rendimento de 437 kg e 465 kg/ha, respectivamente, em relação à população nativa. É importante salientar que a estirpe H 12 passou a ser recomendada, oficialmente, em junho de 2004, para o uso em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro. Foi constatado, ainda, efeito sinergístico entre doses baixas de fertilizantes nitrogenados e a inoculação com estirpes superiores, resultando em incrementos no rendimento em dois outros ensaios.

O subprojeto 3, de estudo da diversidade microbiana e de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em solos cultivados com feijoeiro e soja sob os sistemas de semeadura direta (SD) ou convencional (SC) também é coordenado pela Embrapa Soja. Foram isoladas estirpes a partir de nódulos de raízes de soja coletados em seis propriedades do Mato Grosso, tendo-se constatado maior diversidade genética em solos sob SD e sob cultivo orgânico, quando comparados aqueles 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 de rizóbios.

O subprojeto 4 foi coordenado pelo IAPAR e teve, por objetivo, a identificação de marcadores moleculares que permitam a classificação taxonômica, determinem a variabilidade genética dentro das espécies e permitam a identificação de FMAs colonizando raízes. Foi estabelecida a metodologia e foram identificados oligonucleotídeos ITS (internal transcribed space) que permitiram diferenciar as espécies *Scutellospora heterogama*, *S. pellucida*, *S. gregaria*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora* sp., mas a região 18S rRNA não foi capaz de diferenciar as espécies, devendo-se proceder, agora, ao seqüenciamento direto dos produtos de PCR. De um modo geral, a amplificação com oligonucleotídeos específicos conseguiu detectar colonização micorrízica nas raízes do feijoeiro.



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 (06.04.01.327-03)

Glaciela Kaschuk¹; Mariangela Hungria; Julio Cesar Pires Santos²;
Rubens José Campo

O efeito do manejo do solo na diversidade dos rizóbios foi estudado usando, como modelo, os microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), visto que essa é uma leguminosa hospedeira extremamente promíscua, sendo capaz de nodular com várias espécies de rizóbio. Além disso, a simbiose com o feijoeiro é bastante sensível a variações ambientais.

Foram escolhidas três áreas de uma propriedade rural de Campo Belo do Sul, SC, sendo uma sob semeadura direta (SD), uma sob semeadura convencional (SC) e outra de pecuária extensiva em campo nativo (CN). A altitude média da região é de 1.017 m, clima classificado, segundo

¹ Aluna de mestrado em Microbiologia da UEL

² UDESC

Koepp, de Cfb, com precipitações acima de 1.500 mm por ano. As coordenadas do município são 27°56' latitude Sul e 50°48' longitude Oeste. O solo da área de SD é do tipo Latossolo Bruno, com textura argilosa e teor de matéria orgânica de 3% a 5%, explorada há 20 anos, sendo os últimos 10 anos sob SD. Essa área vem sendo cultivada com feijoeiro e soja, inoculados periodicamente com inoculantes comerciais de rizóbios para essas espécies. O pH foi corrigido para 5,5 e, também, para o teor adequado de nutrientes, conforme a análise de solo. Segundo relatos do agricultor, as produtividades das culturas têm sido boas, em média 2.800 kg de soja/ha, 6.500 kg de milho/ha e 1.500 kg de feijão/ha. O solo da área de SC é do tipo Latossolo Bruno, textura argilosa, com teor de matéria orgânica de 2% a 3%, explorado há três anos. Da mesma maneira que na SD, o pH foi corrigido para 5,5, entretanto, ainda apresentou algumas limitações de nutrientes, pois as produtividades foram inferiores àquela da área de SD. Ambas as lavouras receberam todos os agrotóxicos necessários para a cultura, que foi originalmente implantada no campo nativo. O solo da área de CN é do tipo Cambissolo, com textura argilosa e vem sendo utilizado para a pecuária extensiva, não recebeu fertilizantes ou implantação de leguminosas e é representativo dos solos da região, que são rasos, de pH baixo (4,0 – 5,0), com altos poder de tamponamento e teor de matéria orgânica (aproximadamente 6%). Esses solos são manejados no inverno com o uso do fogo.

Foram obtidas 80 estirpes do sistema SD, 46 do sistema SC e 20 do campo nativo. A caracterização morfológica e fisiológica das estirpes *in vitro* detectou diversidade elevada, com 31 combinações diferentes de morfologia das colônias [cor, produção de muco (exopolissacarídeos), transparência, elevação] e reação ácida ou básica em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono.

Com base nas propriedades morfológicas e fisiológicas, foram selecionadas 36 estirpes do tratamento SD, 36 do tratamento SC e 20 do campo nativo. O DNA dessas estirpes foi extraído e submetido à amplificação pela técnica de PCR com o oligonucleotídeo BOX, para a identificação de estirpes. Foi constatada diversidade genética elevada em todos os três agrupamentos.

No sistema de SC, as estirpes foram distribuídas em nove agrupamentos principais e alguns isolados ocuparam posições isoladas, agrupados em um nível de similaridade final baixo, de apenas 17% (Figura 3.1). Somente três pares de estirpes mostraram perfis idênticos e todos os perfis de estirpes foram bastante distintos daqueles das estirpes utilizadas como referência (Figura 3.1).

Seis agrupamentos principais e quatro estirpes isoladas resultaram na análise dos produtos de BOX-PCR obtidos com as estirpes isoladas do sistema de SD, com um agrupamento final com 23% de similaridade (Figura 3.2). Somente duas estípites apresentaram perfis semelhantes, enquanto três outras agruparam com todas as estirpes utilizadas como referência, com uma similaridade de 46%. O agrupamento que mostrou maior similaridade (agrupamento 3) incluiu 12 estirpes unidas em 52% de similaridade, enquanto que o nível mais baixo de similaridade foi constatado no agrupamento 6 (26%). Claramente, a maioria das estirpes foi bastante distinta das estirpes utilizadas como referência.

As estirpes de rizóbio do campo nativo também foram bastante distintas e uniram-se em um nível final de similaridade de 36% (Figura 3.3). Quatro agrupamentos principais com baixa relação genética entre si foram observados e somente poucas estirpes foram semelhantes. As estirpes-referência de *R. tropici* foram agrupadas em um subgrupo do agrupamento 2 e um grupo contendo quarto estirpe foi unido a este grupo, em um nível de similaridade de 55%. Seis outras estirpes foram posicionadas no agrupamento 1 (47% de similaridade), que incluiu também as estirpes de referência das espécies *R. etli* and *R. giardini*.

Considerou-se o nível de similaridade de 70% na análise por BOX-PCR, para a seleção de estirpes a serem utilizadas para a análise por RFLP-PCR. Desse modo, foram analisadas 24 estirpes do sistema SC, 24 do SD e 20 do campo nativo. Inicialmente, o DNA das bactérias foi amplificado com oligonucleotídeos que amplificam a região que codifica o gene 16S rRNA, conservado entre bactérias e normalmente utilizado em estudos de filogenia para diferenciar entre espécies. A seguir, o produto foi digerido com cinco enzimas de restrição, *Cfol*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI* e *MboI*. Mais uma vez, foi constatada variabilidade genética extre-

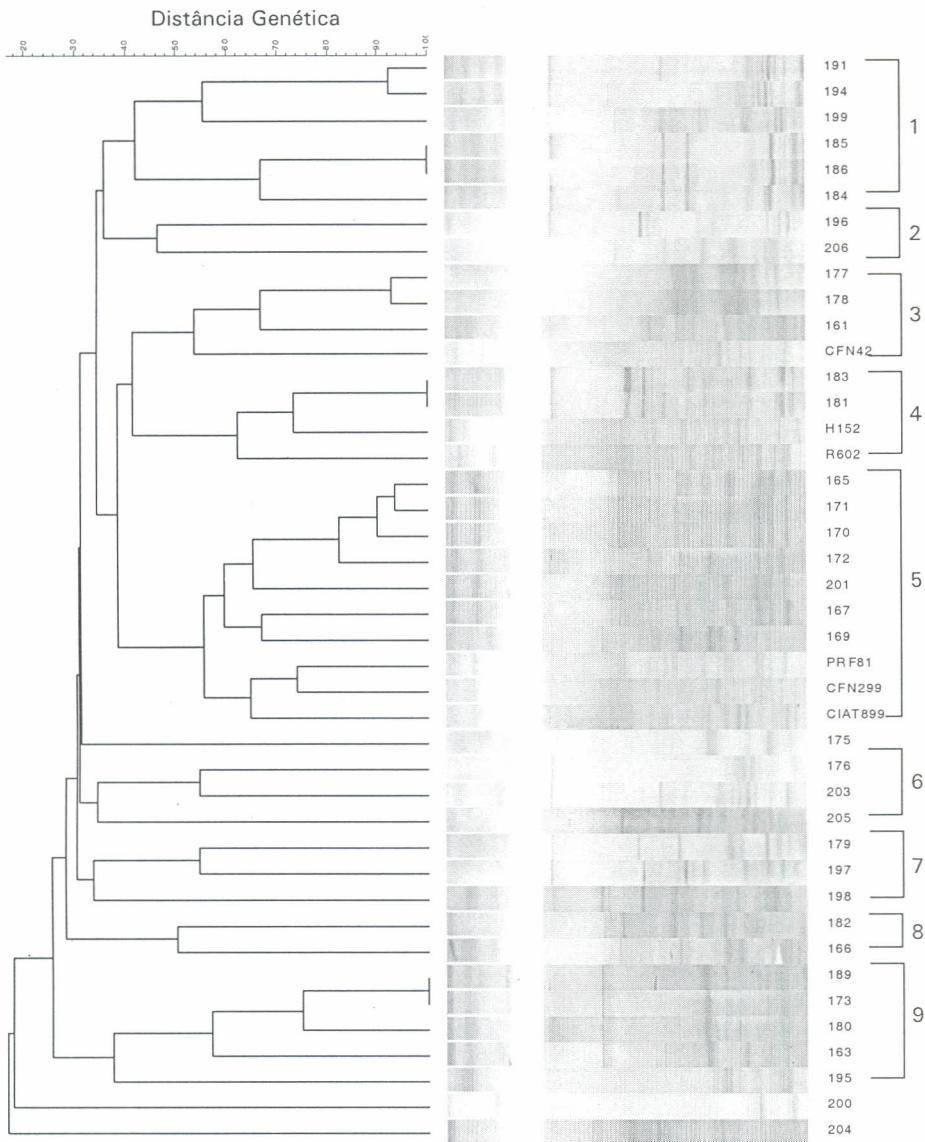


FIG. 3.1. Dendrograma obtido a partir dos produtos da amplificação do DNA com o oligonucleotídeo BOX, usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, das estirpes de rizóbios de feijoeiro, obtidas a partir de solos sob o sistema de semeadura convencional em Campo Belo do Sul, SC.

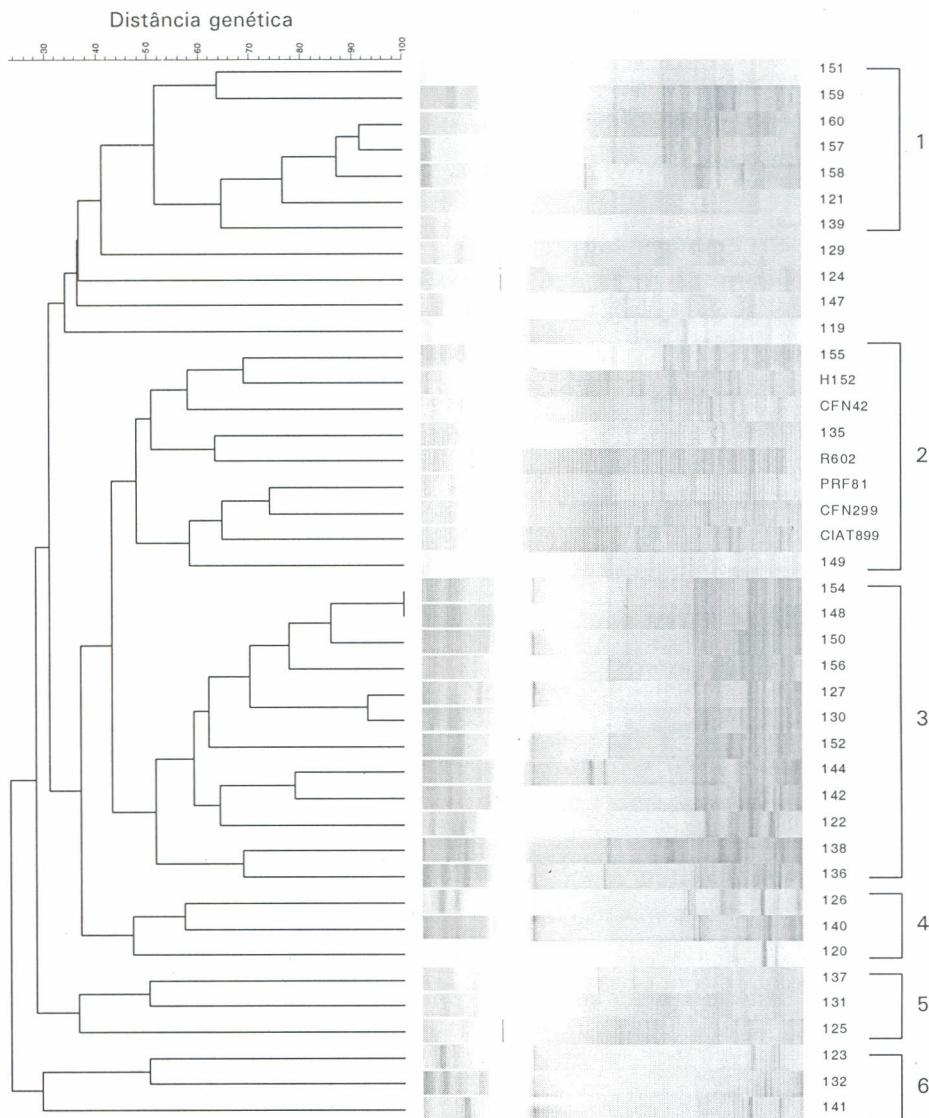


FIG. 3.2. Dendrograma obtido a partir dos produtos da amplificação do DNA com o oligonucleotídeo BOX, usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, das estirpes de rizóbios de feijoeiro, obtidas a partir de solos sob o sistema de semeadura direta em Campo Belo do Sul, SC.

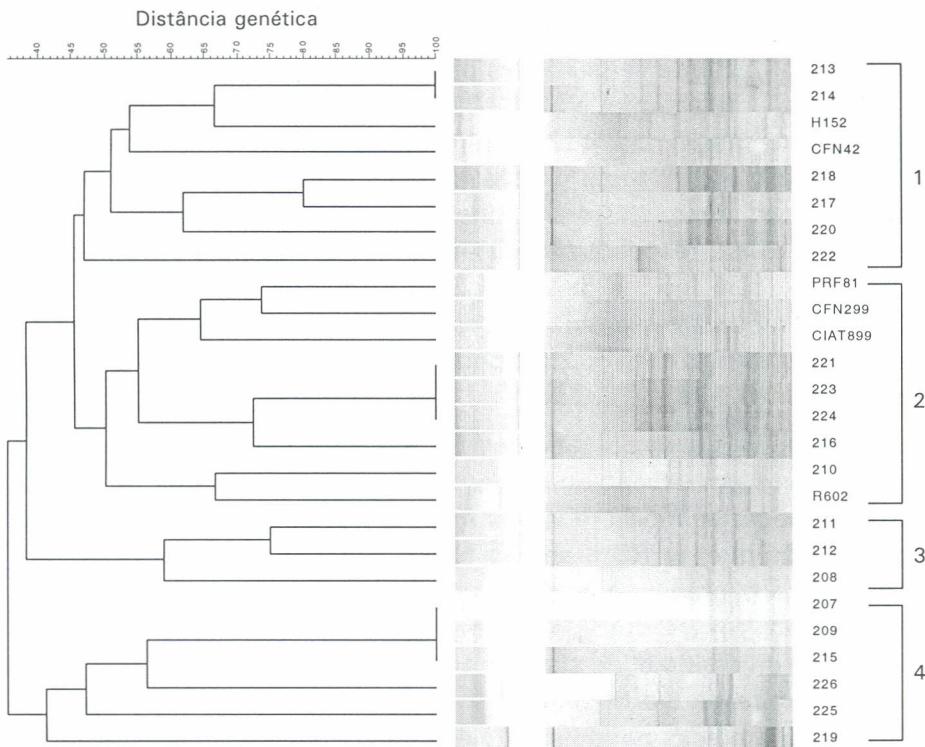


FIG. 3.3. Dendrograma obtido a partir dos produtos da amplificação do DNA com o oligonucleotídeo BOX, usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, das estirpes de rizóbitos de feijoeiro, obtidas a partir de solos de campo nativo em Campo Belo do Sul, SC.

mamente elevada e nenhuma das estirpes desse estudo apresentou perfil semelhante ao das estirpes utilizadas como referência. As estirpes provenientes do campo nativo também apresentaram perfis únicos nessa análise (dados não mostrados).

Considerando a análise por BOX-PCR, os índices de diversidade de Shannon (H'), de Margalef ($R1$), para riqueza e de Pielou ($E1$) para eqüidade foram bastante semelhantes para os sistemas de SD (2,96, 6,47 e 0,93, respectivamente) e SC (3,02, 6,42 e 0,95, respectivamente) e inferiores no campo nativo (2,35, 3,67 e 0,94, respectivamente). Contudo, quando os produtos da análise por RFLP-PCR foram considerados, tanto H' , como $R1$ foram consideravelmente maiores no sistema SD (3,12 e 6,92, respectivamente) do que no SC (2,86 e 5,59, respectivamente), com índices de eqüidade semelhantes (0,97 e 0,99 para SC e SD, respectivamente). Índices inferiores foram obtidos para os isolados do campo nativo: 2,09 para H' , 3,21 para $R1$, com eqüidade semelhante (0,95).

A diversidade genética também foi avaliada pela curva de perfis acumulativos em relação ao número de estirpes analisadas. A diversidade genética na análise por BOX-PCR foi levemente superior no sistema SD do que no SC e ambas foram superiores à diversidade encontrada na pastagem natural (Figura 3.4). Uma situação ainda mais contrastante foi encontrada na análise dos produtos de RFLP-PCR, com maior diversidade no sistema SD do que no SC e destes maior do que no campo nativo (Figura 3.4). A menor diversidade genética na área com gramíneas pode estar relacionada com a ausência da planta hospedeira, mas, provavelmente, reflete o mau manejo da área, com fogo. Os rendimentos na área sob SD foram consistentemente mais elevados do que sob SC, indicando que a diversidade de rizóbios pode ser um parâmetro indicativo da qualidade do solo e da sustentabilidade agrícola.

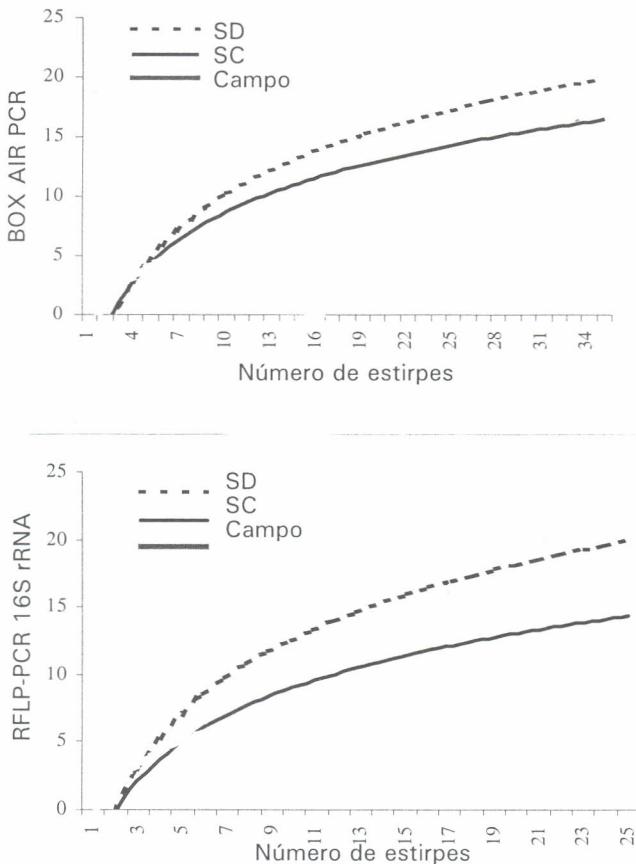


FIG. 3.4. Diversidade genética acumulada das estirpes de rizóbio de feijoeiro em função do número de estirpes e dos perfis de BOX-PCR ou RFLP-PCR da região gênica 16S rRNA, nos sistemas de semeadura direta, semeadura convencional e em campo nativo, em Campo Belo do Sul, SC.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta

Fone: (43) 3371-6000 Fax: (43) 3371-6100

Caixa Postal 231 - CEP 86001-970 Londrina PR

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

E-mail: sac@cnpso.embrapa.br

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**