

# EFEITO DA REINOCULAÇÃO NA SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] EM UM SOLO COM POPULAÇÃO ESTABELECIDADA DE *BRADYRHIZOBIUM* COM AS ESTIRPES SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080<sup>1</sup>

CATALINA Y. MASUDA NISHI<sup>2</sup> e MARIANGELA HUNGRIA<sup>3</sup>

RESUMO - Foram conduzidos três experimentos em um Latossolo Roxo, no Estado do Paraná, com população de *Bradyrhizobium* estabelecida ( $2,21 \times 10^5$  células/g de solo), para verificar os efeitos da reinoculação na soja [*Glycine max* (L.) Merrill] na fixação biológica do N<sub>2</sub> e na produtividade. Todas as seis estirpes testadas, duas da espécie *B. japonicum* e quatro da espécie *B. elkanii*, foram capazes de se estabelecer na rizosfera, aumentando a porcentagem de ocupação dos nódulos. Na safra de 92/93 foram obtidos, pela inoculação, incrementos na produtividade da soja de até 420 kg/ha, com 13,5% mais de N total nos grãos, em relação ao controle sem inoculação e com fertilização nitrogenada. Quando o trigo (*Triticum aestivum* L.) foi plantado como cultura de inverno, nas mesmas parcelas, sem receber qualquer adubação nitrogenada ou inoculação, observou-se uma correlação positiva e significativa entre os tratamentos que haviam apresentado taxas mais elevadas de fixação biológica do N<sub>2</sub> e o teor de N total nos grãos de trigo. Na safra seguinte (93/94), a reinoculação na soja, nas mesmas parcelas e com os mesmos tratamentos da safra anterior, também promoveu incrementos na produtividade e no N total das plantas.

Termos para indexação: ecologia microbiana, fertilizante nitrogenado, fixação biológica do N<sub>2</sub>, metabolismo do N, nodulação, trigo, *Triticum aestivum*.

## EFFECTS OF SOYBEAN [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] INOCULATION IN A SOIL WITH ESTABLISHED POPULATION OF *BRADYRHIZOBIUM* WITH STRAINS SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 AND 5080

ABSTRACT - The effects of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] inoculation were studied in three experiments carried out in an oxysol with established population of *Bradyrhizobium* ( $2.21 \times 10^5$  cells/g of soil). The six strains evaluated, two classified as *B. japonicum* and four as *B. elkanii*, were capable to establish in the rhizosphere and increase the percentage of nodule occupancy in roots. Increases in soybean yield of up to 420 kg/ha, and of 13.5% in the total N content of grains due to inoculation, were observed in relation to the non-inoculated treatment receiving N fertilizer. When wheat (*Triticum aestivum* L.) was grown in the same plots, during the winter, without receiving N fertilizers or inoculants, a positive and statistically significant correlation was observed between the treatments that have shown higher rates of N<sub>2</sub> fixation and the N content in wheat grains. Inoculation of the same plots, with the same treatments, in the following season (93/94) resulted, again, in an enhancement of yield and total N content in soybean grains.

Index terms: biological fixation N<sub>2</sub>, microbial ecology, nitrogen fertilizer, nitrogen metabolism, nodulation, *Triticum aestivum*, wheat.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 23 de fevereiro de 1996.

Extraído da Dissertação de Mestrado da primeira autora, apresentada no Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR.

<sup>2</sup> Biomédica, bolsista de Mestrado do CNPq-RHAE.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>, EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR.

## INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) apresenta grande interesse devido ao seu teor protéico elevado. No Brasil, esta leguminosa é de importância econômica relevante e vem-se tornando cada vez mais viável, economicamente, pela utilização da técnica da inoculação com estirpes do gênero

*Bradyrhizobium*. Embora a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas venha sendo realizada desde os primórdios da introdução dessa cultura no Brasil (Döbereiner et al., 1970), ainda existe grande potencial para incrementar os níveis de produtividade da soja via fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN), pela seleção de estirpes com maior eficiência de conversão do N<sub>2</sub> a amônia (Peres et al., 1984; Vargas et al., 1992a; Hungria et al., 1994).

Nos solos brasileiros, dominam os sorogrupos das estirpes SEMIA 566, SEMIA 5019 (= 29w) e SEMIA 587, que foram ou são utilizadas nos inoculantes comerciais (Hungria et al., 1994). Na EMBRAPA-CPAC, foram obtidas duas variantes das estirpes SEMIA 566 e SEMIA 586, respectivamente a SEMIA 5079 (= CPAC 15) e a SEMIA 5080 (= CPAC 7), capazes de promover incrementos no rendimento de grãos de até 750 kg/ha, em solos da região do Cerrado sem população estabelecida, em relação ao tratamento sem inoculação, enquanto as outras estirpes recomendadas comercialmente, SEMIA 5019 (= 29w) e SEMIA 587, promoveram aumentos de 420 kg/ha (Vargas et al., 1992a). Essas duas estirpes, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, passaram a ser recomendadas, comercialmente, a partir de 1992.

A cada ano, o cultivo da soja em áreas de primeiro cultivo diminui e, conseqüentemente, há um decréscimo no uso de solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Experimentos conduzidos nos Estados Unidos relatam que, em regiões tradicionalmente cultivadas com soja, a reinoculação geralmente não resulta em incremento na nodulação e na eficiência do processo de FBN, em comparação com as plantas sem inoculação (Weaver & Frederick, 1974; Kvien et al., 1981; Singleton & Tavares, 1986).

Faz-se necessário, então, estudar os efeitos e a viabilidade da reinoculação na soja nos solos brasileiros. Com esse propósito, procurou-se desenvolver estudos, relatados neste trabalho, durante duas safras consecutivas, em um solo do Estado do Paraná com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, sobre os efeitos da reinoculação na soja nos parâmetros de fixação biológica do N<sub>2</sub> e na produtividade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estirpes de *Bradyrhizobium*

SEMIA 566, estirpe de *B. elkanii* isolada de inoculante norte-americano no IPAGRO, RS, em 1966; SEMIA 586 (=CB 1809), estirpe de *B. japonicum* isolada no CSIRO, Austrália, e enviada para o Brasil em 1966; SEMIA 5079 (=CPAC 15), estirpe de *B. elkanii* pertencente ao sorogrupo da SEMIA 566 e isolada de um solo de Cerrado do Distrito Federal por pesquisadores da EMBRAPA-CPAC; SEMIA 5080 (=CPAC 7), estirpe de *B. japonicum* obtida na EMBRAPA-CPAC a partir da SEMIA 586 e de seleção de subestirpes mais eficientes; SEMIA 5019 (=29w), estirpe de *B. elkanii* isolada na EMBRAPA-CNPAB e recomendada, comercialmente, desde 1979; SEMIA 587, estirpe de *B. elkanii* isolada pelo IPAGRO, RS, em 1967 e recomendada, comercialmente, de 1968 a 1975 e de 1979 até o presente momento. Essas informações foram obtidas na compilação recente feita por Hungria et al. (1994). As bactérias utilizadas neste estudo foram, originalmente, provenientes dos seguintes laboratórios: IPAGRO, Porto Alegre, RS (SEMIA 566 e SEMIA 587); EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, RJ (SEMIA 586 e SEMIA 5019); EMBRAPA-CPAC, Brasília (SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

### Plantas

Soja (*Glycine max* [L.] Merrill), cultivar BR-16, e trigo (*Triticum aestivum* L.), cultivar BR-23. As sementes foram fornecidas pela EMBRAPA-CNPSo.

### Condução dos experimentos

O primeiro experimento foi conduzido na área experimental da EMBRAPA-CNPSo, no Município de Warta, Londrina, PR, em Latossolo Roxo com as seguintes características químicas na profundidade de 0 cm a 20 cm: pH 5,20 em CaCl<sub>2</sub>; 0,17% de N; 1,73% de C; 0% de Al; 12,70 µg/g de P; cátions (meq/100 g de solo): 0,39 de K, 5,39 de Ca, 1,87 de Mg, 4,16 de H+Al. Foram incorporadas ao solo, aos 45 dias antes do plantio, 2 t/ha de calcário e realizada uma adubação, cinco dias antes do plantio, com 300 kg de N-P-K/ha (0-28-20) e 40 kg de micronutrientes/ha, na forma de FTE-BR-12 (óxido silicatado contendo, em %, Zn= 9,0; B = 1,80; Cu = 0,8; Fe = 3,0; Mn = 2,0; e Mo = 0,10). A população de *Bradyrhizobium* do solo foi determinada pela técnica do número mais provável (NMP), com contagem em soja, em frascos com solução nutritiva e papel de germinação (Andrade & Hamakawa, 1994); a população estabelecida foi de 2,21 x 10<sup>5</sup> células/g de solo. A parcela experimental foi de 3,0 m x 2,0 m, com linhas de soja distanciadas de 0,5 m. Foram utilizados por volta de 30 sementes/m linear da cv. BR-16 e os seguintes tratamentos: 1- SEMIA 5080; 2- SEMIA 5079; 3- SEMIA 586; 4- SEMIA 566; 5- SEMIA 5019; 6- SEMIA 587;

7- controle sem inoculação; 8- controle sem inoculação e adubado com N mineral na dose de 400 kg/ha de N como uréia em dez parcelas semanais de 40 kg/ha, em cobertura, a começar do plantio; 9- controle sem inoculação e adubado com N mineral na dose de 400 kg/ha de N como uréia, em cobertura, com 200 kg/ha no plantio e 200 kg/ha no florescimento. As sementes receberam inoculante preparado em laboratório do CNPSo, com bactérias crescidas em meio extrato de levedura-manitol semi-sólido (Vincent, 1970), na concentração de  $10^9$  células/ml, colocando-se 100 ml de inóculo/kg de semente.

Foram realizadas três coletas (aos 27 dias e 45 dias após o plantio e a coleta final de grãos). Nas duas primeiras coletas, quinze plantas de cada parcela foram utilizadas na determinação do número e da massa de nódulos secos, massa da raiz e da parte aérea secas e teor de nitrogênio nos tecidos das raízes e da parte aérea, avaliado pelo método espectrofotométrico do azul de indofenol (Feije & Anger, 1972). Quarenta nódulos por parcela foram utilizados nas análises sorológicas pela técnica de aglutinação direta em placas de poliestireno em "U" (Nishi, 1994). Na coleta final, foram determinados o rendimento dos grãos, massa de 100 grãos, o teor de N e o teor de óleo dos grãos. O rendimento e massa de 100 grãos foram corrigidos para 13% de umidade após leitura em um aparelho determinador de umidade Vurroughf 700. No teor de óleo, utilizou-se a extração contínua com hexano em aparelho Soxhlet durante seis horas (Pregnoatto & Pregnoatto, 1985).

Após a cultura da soja foi plantado o trigo, cv. BR-23, nas mesmas parcelas, sem receber qualquer adubação nitrogenada ou inoculação. Na coleta final, foram determinados o rendimento dos grãos de trigo e o teor de N dos mesmos.

Na safra seguinte de soja (93/94), o experimento foi repetido com a cv. BR-16 e os mesmos tratamentos, nas mesmas parcelas, analisando-se os parâmetros avaliados na safra anterior, mas com apenas duas coletas, aos 35 dias após o plantio e a coleta final de grãos.

Todos os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No solo com população elevada de *Bradyrhizobium*, de  $2,21 \times 10^5$  células/g de solo, detectou-se, aos 27 dias após o plantio (DAP), um incremento no número de nódulos e na massa nodular, em todas as parcelas com inóculo, em comparação

com a parcela sem inóculo, o que, de modo geral, também ocorreu aos 45 dias (Tabela 1). Nessas coletas, destacou-se o bom desempenho simbiótico da estirpe SEMIA 586, que proporcionou boa nodulação e maior acúmulo de N nos tecidos. Também apresentaram bom desempenho, no parâmetro de acúmulo de N nas plantas aos 45 DAP, as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 566. A aplicação de N mineral na forma de uréia, em doses correspondentes à resposta máxima da cultura da soja (400 kg/ha de N), mas que seriam economicamente inviáveis, não resultou em qualquer benefício para as plantas. A massa radicular não foi afetada pelos tratamentos, mas valores superiores de N total das raízes foram observados, aos 45 DAP, nos tratamentos com inóculo, exceto com a estirpe SEMIA 587 (Tabela 1).

No solo em estudo não havia predominância de nenhum sorogrupo, e os resultados das coletas realizadas aos 27 e 45 DAP confirmam que as estirpes introduzidas, pela inoculação na soja, foram capazes de se estabelecer na rizosfera e infectar as raízes, formando nódulos (Tabela 2). As estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram capazes de formar, em média, 50% dos nódulos das plantas aos 45 DAP, representando um incremento de 140% em relação à testemunha sem inóculo (Tabela 2). A estirpe SEMIA 5019 incrementou a nodulação e as taxas de fixação do  $N_2$  (Tabela 1), embora tenha apresentado menor incremento na ocupação dos nódulos (Tabela 2).

Confirmando os resultados das coletas anteriores, a aplicação de 400 kg/ha de N, na forma de uréia, parcelados em duas ou dez vezes, não resultou em qualquer aumento no rendimento e no teor de N nos grãos (Tabela 3). A estirpe SEMIA 5019 apresentou os melhores rendimentos, superando em 240 kg/ha a testemunha sem inóculo e em 419 kg/ha o tratamento sem inóculo que recebeu fertilizante nitrogenado na forma de uréia, parcelado em duas vezes, embora essas diferenças não tenham sido significativas a 5%. Contudo, em relação ao teor de N total acumulado nos grãos, houve diferença significativa, com superioridade de 13,3% do tratamento com a SEMIA 5019 em relação ao controle com fertilizante nitrogenado parcelado em duas vezes (Tabela 3).

Quando o trigo foi plantado nas mesmas parcelas da safra anterior de soja, sem receber qualquer adubação nitrogenada ou inoculação, observou-se que, embora não houvesse diferença estatisticamente

**TABELA 1. Efeito da inoculação de seis estirpes de *Bradyrhizobium* e da aplicação de fertilizante nitrogenado na nodulação, massa seca e N total acumulado por plantas de soja, cultivar BR-16. Experimento conduzido em um Latossolo Roxo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ( $2,21 \times 10^5$  células/g de solo), na estação experimental da EMBRAPA-CNPSo, em Londrina, PR, na safra 1992/93. Coletas realizadas aos 27 e 45 dias após o plantio (DAP).**

Tratamento	Nodulação		Parte aérea		Raiz		N total das plantas (mgN/pl.)	Eficiência dos nódulos (mg de N/mg de nód.)
	Número (nº/pl.)	M. seca (mg/pl.)	M. seca (g/pl.)	N total (mgN/pl.)	M. seca (g/pl.)	N total (mgN/pl.)		
27 DAP								
SEMIA 5080	10,75 ab <sup>1</sup>	9,04 a	0,72 ab	39,26 ab	0,16 ab	2,60 a	41,86 ab	4,63 a
SEMIA 5079	11,02 a	9,14 a	0,61 b	31,54 b	0,14 ab	2,05 a	33,59 b	3,68 a
SEMIA 586	11,15 a	8,86 a	0,79 a	41,87 a	0,17 a	2,68 a	44,54 a	5,03 a
SEMIA 566	10,39 ab	7,80 a	0,63 b	32,43 ab	0,13 b	1,97 a	34,40 ab	4,41 a
SEMIA 5019	9,92 ab	7,11 a	0,74 ab	40,14 ab	0,15 ab	2,20 a	42,69 ab	6,00 a
SEMIA 587	11,20 a	7,19 a	0,65 ab	35,48 ab	0,15 ab	2,16 a	37,79 ab	5,26 a
Controle <sup>2</sup>	7,65 c	7,19 a	0,59 b	35,50 ab	0,15 ab	2,11 a	34,73 ab	4,83 a
Controle <sup>3</sup>	8,22 bc	5,95 a	0,64 b	36,49 ab	0,15 ab	2,14 a	38,57 ab	6,48 a
Controle <sup>4</sup>	8,07 bc	6,79 a	0,72 ab	39,93 ab	0,15 ab	2,50 a	42,87 ab	6,31 a
CV (%)	17,00	30,44	13,82	16,13	13,88	18,56	15,76	35,79
45 DAP								
SEMIA 5080	20,77 a <sup>1</sup>	63,53 a	3,87 a	160,13 a	0,68 a	8,36 ab	168,49 a	2,65 a
SEMIA 5079	15,45 ab	43,85 abc	4,04 a	181,80 a	0,71 a	9,22 ab	191,02 a	4,36 a
SEMIA 586	15,40 ab	41,18 abc	4,20 a	190,31 a	0,68 a	9,46 ab	199,77 a	4,85 a
SEMIA 566	18,12 ab	45,75 abc	3,81 a	180,43 a	0,73 a	10,30 a	190,73 a	4,17 a
SEMIA 5019	19,00 a	60,50 ab	4,31 a	169,52 a	0,72 a	8,92 ab	178,44 a	2,95 a
SEMIA 587	14,52 ab	39,72 bc	3,49 a	154,67 a	0,61 a	7,20 b	161,87 a	4,08 a
Controle <sup>2</sup>	9,52 c	23,93 c	3,09 a	132,98 a	0,60 a	7,47 ab	140,45 a	5,87 a
Controle <sup>3</sup>	12,38 bc	27,88 c	3,47 a	146,96 a	0,65 a	7,79 ab	154,75 a	5,55 a
Controle <sup>4</sup>	15,57 ab	42,66 abc	3,36 a	146,71 a	0,64 a	7,40 ab	154,11 a	3,61 a
CV (%)	25,13	32,75	21,83	26,88	18,87	20,72	26,16	45,90

<sup>1</sup> Médias de quatro parcelas, cada uma com quinze plantas amostradas, e valores seguidos pela mesma letra não diferem, estatisticamente, em cada parâmetro ( $P \leq 0,05$ , Duncan).

<sup>2</sup> Controle sem inóculo.

<sup>3</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados, semanalmente, em dez vezes.

<sup>4</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados em duas vezes, no plantio e no florescimento.

**TABELA 2.** Efeito da inoculação em sementes de soja, cultivar BR-16, em um Latossolo Roxo do Paraná com população de  $2,21 \times 10^5$  células de *Bradyrhizobium*/g de solo, na ocorrência dos sorogrupos nos nódulos. Avaliações realizadas aos 27 e 45 dias após o plantio (DAP). Londrina, PR, safra 1992/93.

Tratamento	Estirpe introduzida					
	Sorogrupo 586		Sorogrupo 566		Sorogrupo 5019 5019	Sorogrupo 587 587
	586	5080	566	5079		
27 DAP						
Sem inoculação	17,50 b <sup>1</sup>		36,88 b		20,00 a	11,88 a
Com inoculação	51,25 a	30,80 b	67,78 a	56,38 ab	36,88 a	39,38 a
CV (%)	29,84		31,21		61,62	104,32
45 DAP						
Sem inoculação	20,63 b		21,25 b		20,63 b	12,50 b
Com inoculação	51,25 a	43,75 a	53,75 a	53,75 a	36,25 a	32,50 a
CV (%)	15,55		21,09		5,95	27,96

<sup>1</sup> Os valores representam médias de quatro parcelas, com 40 nódulos amostrados por parcela e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem, estatisticamente, em cada coleta, dentro de cada sorogrupo (Duncan,  $P \leq 0,05$ ).

**TABELA 3.** Rendimento de grãos, massa de 100 grãos e teores de óleo e nitrogênio nos grãos de soja, cultivar BR-16, com inóculo de seis estirpes de *Bradyrhizobium*, sem inóculo ou com fertilização nitrogenada. Londrina, PR, safra 1992/93.

Tratamento	Rendimento <sup>1</sup> de grãos (kg/ha)	Massa seca <sup>1</sup> de 100 grãos (g)	N total dos grãos (kg N/ha)	Óleo total dos grãos (kg óleo/ha)
SEMIA 5080	4.137 a <sup>2</sup>	18,35 bcd	263,53 abc	765,76 b
SEMIA 5079	3.892 a	17,75 d	245,97 c	736,37 b
SEMIA 586	4.043 a	18,91 abc	272,90 ab	782,32 ab
SEMIA 566	4.109 a	18,42 bcd	275,71 ab	839,06 a
SEMIA 5019	4.400 a	18,07 cd	286,00 a	784,96 ab
SEMIA 587	4.124 a	18,21 bcd	272,18 ab	803,35 ab
Controle <sup>3</sup>	4.160 a	19,83 a	275,81 ab	794,98 ab
Controle <sup>4</sup>	4.234 a	19,27 ab	269,28 ab	831,13 a
Controle <sup>5</sup>	3.981 a	18,50 bcd	252,39 bc	795,40 ab
CV (%)	9,94	3,52	5,83	6,75

<sup>1</sup> Corrigidos para 13% de umidade.

<sup>2</sup> Os valores representam médias de quatro parcelas, com 15 plantas amostradas por parcela e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem, estatisticamente, em cada parâmetro ( $P \leq 0,05$ , Duncan).

<sup>3</sup> Controle sem inóculo.

<sup>4</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados, semanalmente, em dez vezes.

<sup>5</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados, em duas vezes, no plantio e no florescimento.

significativa, o rendimento e o teor de N dos grãos de trigo foram superiores nas parcelas que haviam mostrado o melhor desempenho simbiótico na soja. Desse modo, o trigo plantado nas parcelas em que a soja havia recebido o inóculo da SEMIA 5019 produziu 396 kg/ha mais do que as parcelas que não haviam recebido inóculo (Tabela 4). Foi possível detectar, então, uma correlação linear positiva entre o N total dos grãos de soja e o N total dos grãos de trigo (Fig. 1).

Na safra de soja seguinte (93/94), quando as parcelas foram reinoculadas com os mesmos tratamentos do ano anterior, aos 35 DAP observaram-se resultados semelhantes aos obtidos na safra de 92/93, na qual a estirpe SEMIA 586 apresentou uma boa nodulação. Os teores mais elevados de N nos tecidos, porém, foram obtidos pela inoculação da SEMIA 5019 (Tabela 5).

Embora os resultados não diferissem estatisticamente a 5%, mais uma vez a estirpe SEMIA 5019 apresentou os melhores rendimentos, superando em 425 kg/ha a testemunha sem inóculo e em 637 kg/ha, com 24,7% mais de N total nos grãos, a testemunha sem inoculação que recebeu 400 kg/ha de N na forma de uréia, parcelados em duas vezes (Tabela 6).

**TABELA 4. Rendimento de grãos, %N e N total acumulado nos grãos de trigo, cv. BR-23, cultivado em parcelas que, na safra anterior de soja, haviam ou não recebido inóculos ou recebido fertilizante nitrogenado. A cultura do trigo não recebeu qualquer fonte de fertilizante nitrogenado ou inoculação. Londrina, PR, safra de 1993.**

Tratamento na cultura da soja	Rendimento de grãos <sup>1</sup> (kg/ha)	N total dos grãos (kg N/ha)
SEMIA 5080	3.612 <sup>2</sup>	63,57
SEMIA 566	3.309	60,56
SEMIA 586	3.699	66,58
SEMIA 566	3.450	65,21
SEMIA 5019	3.746	71,55
SEMIA 587	3.458	64,67
Controle <sup>3</sup>	3.350	67,67
Controle <sup>4</sup>	3.366	68,33
Controle <sup>5</sup>	3.518	65,79
CV (%)	12,19	11,19

<sup>1</sup> Corrigidos para 13% de umidade.

<sup>2</sup> Os valores representam médias de quatro parcelas, com 15 plantas amostradas por parcela e não diferiram estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Duncan) para cada parâmetro analisado.

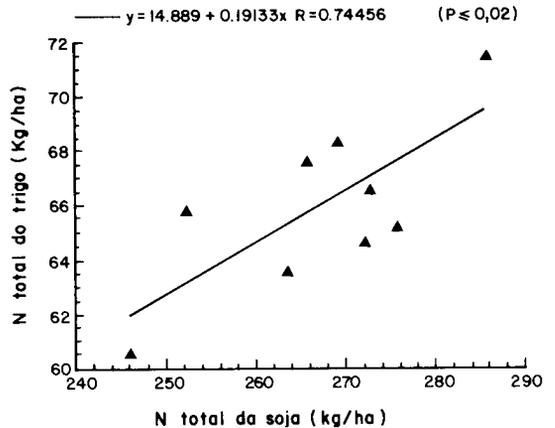
<sup>3</sup> Controle sem inóculo.

<sup>4</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados, semanalmente, em dez vezes.

<sup>5</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia, em cobertura e parcelados em duas vezes, no plantio e no florescimento.

Devido à expansão das áreas cultivadas com soja, a cada ano a área de primeiro plantio de soja fica menor e poucos são os resultados de pesquisa, no Brasil, a respeito do efeito da reinoculação no estabelecimento ou na produtividade da cultura. Os benefícios da reinoculação ainda são bastante controversos.

Resultados obtidos nos Estados Unidos demonstraram que populações tão baixas quanto 20 a 50 células de rizóbio/g de solo eliminam a resposta à inoculação, desde que algumas dessas bactérias sejam eficientes (Singleton & Tavares, 1986; Thies et al., 1991). Thies et al. (1991) também observaram que, para haver uma resposta à inoculação, pelo menos 66% dos nódulos da planta precisavam ser formados pela estirpe introduzida. Nessas condições, mesmo quando inoculantes muito efetivos formam a



**FIG. 1. Relação linear entre o N total (kg N/ha) dos grãos de soja (X) na safra 1992/93 e o N total (kg N/ha) dos grãos de trigo (Y), plantado durante o inverno nas mesmas parcelas da soja sem receber qualquer adubação nitrogenada ou inoculação. Foram considerados os valores referentes às médias de quatro repetições, cada uma representando uma parcela com quinze plantas. Experimento conduzido em um Latossolo Roxo, na estação experimental da EMBRAPA-CNPSo, Londrina, PR.**

maioria dos nódulos, muitas vezes é difícil detectar resposta à inoculação (Weaver & Frederick, 1974; Thies et al., 1991). Diversas estratégias têm sido empregadas, nos EUA, para solucionar esse impasse, como o desenvolvimento de cultivares que restringem a nodulação pelas estirpes predominantes no solo (Cregan et al., 1989; Sadowsky & Cregan, 1992), a seleção de estirpes mais competitivas (revisado em Triplett, 1990), a inoculação de estirpes em altas concentrações e inoculações maciças por períodos prolongados (Dunningan et al., 1984; Triplett & Sadowsky, 1992) e o estudo das condições ambientais que podem afetar a competitividade (revisado em Bottomley, 1992), entre outros.

Hoje, embora também estejam sendo conduzidos estudos, no Brasil, sobre cultivares que restrinjam a nodulação pelas bactérias dominantes no solo (Hungria et al., 1994) e de estirpes mais eficientes e competitivas (Vargas et al., 1992a, 1992b; Hungria et al., 1994), já foram relatadas respostas à reinoculação em solos do Cerrado (Vargas et al., 1992b). No caso deste experimento, conduzido na região Sul, em um solo com uma população estabelecida elevada de *Bradyrhizobium*,  $2,21 \times 10^5$  células/g de solo, também

**TABELA 5.** Efeito da reinoculação em soja, cv. BR-16, de seis estirpes de *Bradyrhizobium* e da aplicação de fertilizante nitrogenado na nodulação, massa seca e N total acumulado pelas plantas aos 35 dias após o plantio. Experimento conduzido em um LR, nas mesmas parcelas que haviam recebido esses tratamentos na safra anterior. Londrina, PR, safra 1993/94.

Tratamento	Nodulação		Parte aérea		Raiz		N total das plantas (mg N/pl.)	Eficiência dos nódulos (mg N/mg nód.)
	Número (nº/pl.)	M. seca (mg/pl.)	M. seca (g/pl.)	N total (mg N/pl.)	M. seca (g/pl.)	N total (mg N/pl.)		
SEMIA 5080	8,25 b <sup>1</sup>	33,93 abc	2,01 ab	94,45 b	0,39 b	6,92 b	101,37 b	2,99 bc
SEMIA 5079	9,25 b	26,18 bc	1,82 b	82,69 b	0,32 b	5,11 b	87,81 b	3,35 bc
SEMIA 586	12,45 ab	52,25 ab	2,22 ab	103,24 b	0,41 b	7,28 b	110,51 b	2,12 c
SEMIA 566	9,65 b	29,35 bc	1,57 b	83,85 b	0,34 b	6,17 b	90,03 b	3,07 bc
SEMIA 5019	9,98 b	30,85 bc	2,74 a	146,54 a	0,58 a	10,71 a	157,25 a	5,10 ab
SEMIA 587	10,75 ab	36,85 abc	2,05 ab	94,38 b	0,43 b	7,68 b	106,06 b	2,77 bc
Controle <sup>2</sup>	8,35 b	14,88 c	1,73 b	72,30 b	0,33 b	6,35 b	78,65 b	5,29 ab
Controle <sup>3</sup>	8,45 b	12,90 c	1,97 ab	76,23 b	0,34 b	7,37 b	104,20 b	8,08 a
Controle <sup>4</sup>	15,70 a	61,23 a	2,10 ab	95,92 b	0,42 b	8,27 ab	83,61 b	1,37 c
CV (%)	31,28	49,88	26,08	30,22	21,94	26,17	29,47	51,57

<sup>1</sup> Médias de quatro parcelas, cada uma com 15 plantas amostradas e valores seguidos pela mesma letra, não diferem, estatisticamente, para cada parâmetro ( $P \leq 0,05$ , Duncan).

<sup>2</sup> Controle sem inóculo.

<sup>3</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg N/ha na forma de uréia, em cobertura, parcelados, semanalmente, em dez vezes.

<sup>4</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg N/ha na forma de uréia, em cobertura, parcelados em duas vezes, no plantio e no florescimento.

**TABELA 6.** Rendimento de grãos, massa de 100 grãos e teores de óleo e nitrogênio nos grãos de soja, cultivar BR-16, com reinoculação de seis estirpes de *Bradyrhizobium*, sem inoculação ou recebendo fertilizante nitrogenado. Londrina, PR, safra 1993/94.

Tratamento	Rendimento <sup>1</sup> de grãos (kg/ha)	Massa <sup>1</sup> de 100 grãos (g)	N total dos grãos (kg N/ha)	Óleo total dos grãos (kg óleo/ha)
SEMIA 5080	3.063 ab <sup>2</sup>	18,46 ab	160,19 b	539,09 ab
SEMIA 5079	2.638 ab	17,73 ab	143,24 b	447,14 b
SEMIA 586	3.050 ab	17,91 ab	168,97 ab	529,48 ab
SEMIA 566	2.538 b	18,10 ab	145,68 ab	466,48 ab
SEMIA 5019	3.550 a	19,36 a	202,71 a	642,91 a
SEMIA 587	2.338 b	17,54 ab	133,97 b	420,84 b
Controle <sup>3</sup>	3.125 ab	17,66 ab	188,75 ab	547,50 ab
Controle <sup>4</sup>	3.125 ab	18,83 ab	182,81 ab	519,69 ab
Controle <sup>5</sup>	2.913 ab	16,95 b	162,54 ab	502,49 ab
CV (%)	20,57	6,91	20,44	21,50

<sup>1</sup> Corrigidos para 13% de umidade.

<sup>2</sup> Os valores representam médias de quatro parcelas, com 10 plantas amostradas por parcela e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem, estatisticamente, para cada parâmetro analisado ( $P \leq 0,05$ , Duncan).

<sup>3</sup> Controle sem inóculo.

<sup>4</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia parcelados, semanalmente, em dez vezes.

<sup>5</sup> Controle sem inóculo recebendo 400 kg/ha de N na forma de uréia e parcelados em duas vezes, no plantio e no florescimento.

se observou que as estirpes introduzidas foram capazes de produzir incrementos na produtividade não só na presença desta população naturalizada elevada, como também sem ter ocupado uma porcentagem elevada dos nódulos. Isso indica que mais estudos precisam ser conduzidos sobre a ecologia rizobiana nos solos brasileiros, pois talvez nossas condições de clima e solo possam conduzir a maior perda da eficiência das estirpes naturalizadas.

Foi demonstrado, mais uma vez, a ineficácia da adubação nitrogenada na soja, conforme relatado por Vargas & Suhet (1982), Vargas et al. (1982) e Hungria et al. (1994), em compilação recente de diversos ensaios conduzidos no Brasil. Doses elevadas de N mineral, na forma de uréia, afetaram negativamente a nodulação e o processo de fixação do  $N_2$ , não resultando em maior rendimento da soja e sim em menor acúmulo de N nos grãos em relação ao controle sem inóculo e sem adubação. Esses resultados, portanto, concordam com relato semelhante feito por Munns (1977), podendo-se concluir que o N mineral prejudicou a população naturalizada do solo que, mesmo não sendo tão eficiente quanto algumas estirpes introduzidas via inoculante,

ainda trouxe mais benefícios à nutrição nitrogenada da soja.

Quando o trigo foi plantado nas mesmas parcelas do experimento de soja, encontrou-se que o N dos grãos e o rendimento foram superiores nos tratamentos de melhor desempenho simbiótico na soja, indicando que esses tratamentos deixaram mais N nas parcelas para a cultura seguinte, ou pelos resíduos culturais ou porque deixaram de retirar N do reservatório de nutrientes do solo.

Na segunda safra de soja (93/94), apesar de ter ocorrido uma deficiência hídrica na fase inicial, que prejudicou a germinação e o desenvolvimento inicial das plantas, ainda foi possível obter, pela reinoculação na soja, incrementos no rendimento e teor de N nos grãos via fixação biológica do nitrogênio.

O melhor desempenho simbiótico, nas duas safras, foi obtido pela inoculação, na soja, da estirpe SEMIA 5019, que vem sendo utilizada, na região Sul, desde 1979. A superioridade dessa estirpe em relação à SEMIA 5079 e à SEMIA 5080, que foram isoladas após a adaptação em solos do Cerrado e que proporcionam, nessas regiões, aumentos consideráveis de produtividade, conduzem à hipótese de que os programas de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas devem ser realizados a partir de isolados adaptados a cada região. Certamente, em futuro próximo, a recomendação de estirpes de *Bradyrhizobium* também será regionalizada.

Até então, pela utilização das técnicas tradicionais de sorologia, era impossível diferenciar as estirpes parentais das variantes adaptadas, como é o caso do par de estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079 e do par SEMIA 586 e SEMIA 5080. Com o desenvolvimento da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) para essas estirpes, porém, elas podem ser facilmente diferenciadas (Nishi, 1995), e estudos mais esclarecedores poderão ser conduzidos sobre as variantes obtidas a partir de uma estirpe parental, mas que a superam em eficiência e competitividade.

Pelos resultados de duas safras aqui relatados e de outros conduzidos desde então (Hungria et al., 1994) pode-se concluir que, pelo menos no Estado do Paraná, a reinoculação permite um incremento de pelo menos 10% na produtividade. Além disso, a

soja deixa de retirar o N do solo para manter a sua elevada demanda que, conforme foi constatado na primeira coleta, pode se aproximar de 300 kg/ha de N exportados pelos grãos. A manutenção dos teores de N do solo beneficiarão a nutrição da cultura seguinte que, no caso, foi o trigo. Logicamente, não se deixa de mencionar, ainda, as contribuições para uma agricultura auto-sustentável e para a preservação ambiental, com diminuição da poluição dos rios e lagos, decorrente, particularmente, da lixiviação do nitrato.

## CONCLUSÕES

1. A reinoculação na soja permitiu a obtenção de incrementos no rendimento e teor de N nos grãos dessa leguminosa.
2. A aplicação de fertilizante nitrogenado, na dose de 400 kg/ha de N na forma de uréia, parcelados em duas ou dez vezes, não resultou em nenhum aumento na produtividade ou no teor de N nos grãos da soja.
3. Houve benefício para a cultura que sucedeu à da soja com inóculo, resultando em incremento nos teores de N nos grãos do trigo.

## AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores Milton A.T. Vargas e Ieda C. Mendes, da EMBRAPA-CPAC, pela colaboração, pelas sugestões e pelo grande apoio em todas as fases de condução dos experimentos. Aos funcionários do Laboratório de Solos, Lígia Maria de O. Chueire e Rinaldo B. Conceição, e aos técnicos agrícolas, José Zucca de Moraes e Rubson N. O. Sibaldelli, da EMBRAPA-CNPSO, pelo auxílio técnico imprescindível na condução dos experimentos. Ao CNPq, pela bolsa de Mestrado para C. Y. M. Nishi e pela bolsa de pesquisa para M. Hungria. Este projeto foi parcialmente financiado pelo CNPq (500012/92-0).

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.

- BOTTOMLEY, P.J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.293-423.
- CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H.; SADOWSKY, M.J. Soybean genotype restricting nodulation of a previously unrestricted serocluster 123 *Bradyrhizobia*. **Crop Science**, Madison, v.29, p.307-312, 1989.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970.
- DUNINGAN, E.P.; BOLLIICH, P.K.; HUTCHINSON, R.L.; HICKS, P.M.; ZAUNBRECHER, F.C.; SCOTT, S.G.; MOWERS, R.P. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, p.463-466, 1984.
- FEIJE, F.; ANGER, V. Spot tests in inorganic analyses. **Analytical Chemistry Acta**, Netherlands, v.149, p.363-367, 1972.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.9-89.
- KVIEN, C.S.; HAM, G.E.; LAMBERT, J.W. Recovery of introduced *Rhizobium japonicum* by soybeans genotypes. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.900-905, 1981.
- MUNNS, D.N. Mineral nutrition and the legume simbioses. In: HARDY, R.W.F.; GIBSON, A.J. (Eds.). **A treatise on dinitrogen fixation**. Sector IV: agronomy and ecology. New York: John Wiley & Sons, 1977. p.353-391.
- NISHI, C.Y.M. Identificação sorológica de *Bradyrhizobium/Rhizobium*. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.171-181.
- NISHI, C.Y.M. **Infecção, competitividade e eficiência da fixação biológica do nitrogênio em soja (*Glycine max* [L.] Merrill) inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080**. Londrina: UEL, 1995. 110p. Dissertação de Mestrado.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Variabilidade de eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.8, p.193-196, 1984.
- PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. Métodos analíticos e físicos para análise de alimentos. In: REBOCHO, D.D.E. (Ed.). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. p.42.
- SADOWSKY, M.J.; CREGAN, P.B. The soybean *Rj4* allele restricts nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* serogroups 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.720-723, 1992.
- SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.1013-1018, 1986.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.19-28, 1991.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.3, p.199-206, 1990.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.399-428, 1992.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.8, p.1127-1132, 1982.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I. de C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. **Dois novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992a. 3p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62).

- VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. **Adu-  
bação nitogenada e inoculação da soja em solos  
de Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1982.  
11p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 13).
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I. de C.; SUHET, A.R.;  
PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio. In:  
SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SOJA NOS  
CERRADOS, 1., 1992, Uberaba. **Anais...** Piracicaba:  
POTAFOS, 1992b. p.159-182.
- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root  
nodule bacteria**. Oxford: Blacwell, 1970. 164p.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum  
rate on competitive nodulation of *Glycine max* L.  
Merrill. II. Field studies. **Agronomy Journal**,  
Madison, v.66, p.233-236, 1974.