

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**INOCULAÇÃO DE SOJA EM SOLO SUBMETIDO A DIFERENTES
SISTEMAS DE MANEJO**

Mariel Josué Bizarro
(Dissertação)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**INOCULAÇÃO DE SOJA EM SOLO SUBMETIDO A DIFERENTES
SISTEMAS DE MANEJO**

MARIEL JOSUÉ BIZARRO
Engenheiro-Agrônomo (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS), Abril de 2004

A meu avô, Seno Edmundo Helfer, pelo exemplo de vida e pelo estímulo em seguir esta carreira, da qual me orgulho. A você mãe (Lucia) pela educação, apoio e incentivo, e às minhas queridas irmãs (Janaína e Greice) pelo convívio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Pedro Alberto Selbach pela amizade, orientação, confiança e apoio recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá pela amizade e contribuições a esta pesquisa.

Ao pesquisador da FEPAGRO, Engenheiro Agrônomo Dr. Luciano Kayser pelo convívio e auxílio nas análises sorológicas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela possibilidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente de Pós-Graduação em Ciência do Solo e da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do PPG – Ciência do Solo da UFRGS pelo convívio durante todo o curso.

Aos funcionários do Departamento de Solos Jader, Denise, Cíntia, e especialmente ao José (Zé) e Agostinho pela ajuda na condução dos experimentos no campo e na casa de vegetação.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS: Cássia, Carlos, Christine, Greice, Jonatas, Márcia, Márcio e Martin.

Aos amigos Adriana Giongo, Alejandra Carballo, Fabíola Carvalho, Luiz Fernando W. Roesch e Rafael Gadea pela ajuda e amizade.

A todos amigos que sempre acreditaram em mim e torceram, mesmo que de longe, para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

INOCULAÇÃO DA SOJA EM SOLO SUBMETIDO A DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO ⁽¹⁾

Autor: Mariel Josué Bizarro

Orientador: Prof. Pedro Alberto Selbach

RESUMO

A soja (*Glycine max*) destaca-se pela importância econômica e pela capacidade de associação simbiótica com bactérias (*Bradyrhizobium* spp e *Sinorhizobium* spp) fixadoras do dinitrogênio. O benefício da fixação biológica do nitrogênio (FBN) é potencializado pela inoculação. Entretanto, a resposta à inoculação depende de fatores bióticos e abióticos, que variam de acordo com o sistema de manejo do solo. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta à inoculação e reinoculação da soja, além da sobrevivência e a competitividade das estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) em diferentes sistemas de manejo do solo. O experimento, com diferentes sistemas de manejo do solo, foi iniciado em 2000, a partir de campo nativo, sendo avaliado nos anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003. Os tratamentos consistiram de adubação orgânica, mineral e adubação mineral com irrigação, todos utilizando sistemas de preparo plantio direto, plantio reduzido e plantio convencional, com ou sem inoculação. Foram avaliados o teor de nitrogênio mineral do solo, o número e a massa de nódulos, a massa e o nitrogênio total do tecido da parte aérea e a produção dos grãos, além da ocupação nodular pelas estirpes inoculadas, avaliadas por soroglutinação. A inoculação avaliada promoveu um aumento médio na produção de grãos de 200 kg ha⁻¹ em 2000/2001 e a reinoculação de 125 kg ha⁻¹ na parcela irrigada em 2002/2003. Teores de nitrogênio mineral do solo acima de 12 mg kg⁻¹ determinaram redução no número e massa de nódulos. As estirpes SEMIA 587 e 5019 apresentaram maior sobrevivência e competitividade. As SEMIA 5079 e 5080 demonstraram maior dependência da inoculação. Os dados obtidos mostram que a sobrevivência e competitividade das estirpes são características pouco influenciadas pelo sistema de manejo do solo.

⁽¹⁾ Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (59p.) Abril, 2004.

SOYBEAN INOCULATION IN SOIL UNDER DIFFERENT MANAGEMENT SYSTEMS

Author: Mariel Josué Bizarro

Adviser: Prof. Pedro Alberto Selbach

ABSTRACT

The soybean crop (*Glycine max*) stands out for the economical importance besides the capacity of nitrogen fixation through association with bacteria of *Bradyrhizobium* spp and *Sinorhizobium* spp. The inoculation process can improve the biological nitrogen fixation (BNF), otherwise the biotic and abiotic factors, as a consequence of the soil management system, can affect the inoculation success. The objectives of this research were to evaluate soybean inoculation and re-inoculation, besides the survival and competitiveness of *B. elkanii* strains (SEMIA 587 and 5019) and *B. japonicum* strains (SEMIA 5079 and 5080) under different soil management systems. The field experiment carried out during the 2000/2001 and 2002/2003 cropping seasons, was established over an area without cropping before. The treatments were organic fertilizer, mineral fertilizer and mineral fertilizer plus irrigation. All the treatments were submitted to no tillage, minimal tillage, and conventional tillage, with and without inoculation. It was evaluated soil mineral nitrogen, number and mass of nodules, nitrogen and mass of plants aerial part, grain yield, grain nitrogen content, and nodules occupancy by inoculated strains. It was observed an increment in the grain yield of 200 kg ha⁻¹ due to inoculation and of 125 kg ha⁻¹ due re-inoculation under irrigation, during the 2000/2001 and 2002/2003 cropping seasons, respectively. The nodulation, number and mass of nodules, were affected negatively by higher concentrations of mineral nitrogen in soil (over 12 mg ha⁻¹). The strains SEMIA 587 and 5019 showed better survival and competitiveness, while SEMIA 5079 and 5080, less competitive, were dependent on the re-inoculation. The strains survival and competitiveness were not affected by different soil management systems.

(1) Master of Science dissertation in Soil Science, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (59p.) April, 2004.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A cultura da soja	03
2.1.1 Origem e dispersão da soja	03
2.1.2 Taxonomia e descrição botânica da espécie <i>Glycine max</i>	04
2.1.3 Características gerais da espécie <i>Glycine max</i>	04
2.2 O gênero <i>Bradyrhizobium</i>	06
2.2.1 Taxonomia do microssimbionte	06
2.2.2 Características gerais do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	07
2.3 Inoculação das sementes de soja	08
2.3.1 Tipos de inoculantes	08
2.3.2 Procedimentos e dosagens	09
2.4 Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N ₂	09
2.4.1 Qualidade do inoculante	09
2.4.2 Elementos edafo-climáticos	11
2.4.3 Nitrogênio mineral	13
2.4.4 Preparo do solo	13
2.4.5 Sobrevivência e competitividade nodular	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Tratamentos	19
3.2 Linhagens bacterianas.....	22
3.3 Cultivares de soja	23
3.4 Avaliações efetuadas.....	23
3.4.1 Nodulação.....	24
3.4.2 Nitrogênio mineral do solo	25
3.4.3 Produção de grãos e fertilidade do solo.....	25
3.5 Determinação da sobrevivência, no solo, das estirpes inoculadas.....	25
3.6 Tipificação das estirpes presentes em nódulos de soja após a segunda inoculação	26
3.7 Análise estatística.....	28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Resposta à inoculação	29
4.1.1 Número e massa de nódulos	29
4.1.2 Matéria seca e o nitrogênio total do tecido da parte aérea das plantas	32
4.1.3 Produção de grãos e teor de nitrogênio nos grãos	34
4.2 Nitrogênio mineral do solo	36
4.3 Efeito do teor de nitrogênio mineral do solo na nodulação e rendimento da soja.....	38
4.4 Sobrevivência e migração, no solo, das estirpes inoculadas....	41
4.5 Tipificação das estirpes inoculadas presentes em nódulos de soja após a segunda inoculação	42
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7. APÊNDICES.....	56

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 Fatores que interferem na fixação biológica do nitrogênio: síntese de alguns fatores que limitam a fixação biológica do nitrogênio e possíveis recomendações.....	10
Tabela 2 Relação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp utilizadas.....	24
Tabela 3 Fases fenológicas da cultura da soja e respectivas simbologias.....	25
Tabela 4 Cronograma das atividades relevantes, amostragens e avaliações realizadas no experimento de campo, no período 2000-2003	26
Tabela 5 Número e massa seca de nódulos no estádio do quinto nó e no florescimento pleno da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2000/2001.....	32
Tabela 6 Número e massa seca de nódulos no estádio do quinto nó e no florescimento pleno da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2002/2003.....	33
Tabela 7 Massa seca e teor de nitrogênio da parte aérea das plantas no estádio do quinto nó e no florescimento pleno da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2000/2001.....	35
Tabela 8 Massa seca e teor de nitrogênio da parte aérea das plantas no estádio do quinto nó e no florescimento pleno da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2002/2003.....	36
Tabela 9 Produção e teor de nitrogênio nos grãos. Média de duas repetições. Anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003.....	38
Tabela 10 Ocupação nodular da cultivar de soja BRS-156 desenvolvida em vaso Leonard esterilizado. Inoculado com suspensão de solo amostrado nos tratamentos do experimento de campo, após dois anos da primeira inoculação (2000/2001). Valores referentes a 40 nódulos avaliados por tratamento. Média de duas repetições.	45
Tabela 11 Ocupação nodular da cultivar de soja BRS-156 avaliada em diferentes tratamentos do experimento de campo. Referente ao segundo cultivo (2002/2003). Valores referentes a 40 nódulos avaliados por tratamento. Média de 2 repetições	47

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1	Esquema da área experimental..... 20
Figura 2	Correlação entre massa seca de nódulos e produção de grãos de soja. Massa de nódulos avaliados no estágio V5 no ano agrícola de 2000/2001. Os dados correlacionados pertencem ao bloco com tratamento adubação mineral com irrigação 39
Figura 3	Correlação entre massa seca de nódulos e produção de grãos de soja. Massa de nódulos avaliados no estágio V5 no ano agrícola de 2002/2003. Os dados correlacionados pertencem ao bloco com tratamento adubação mineral com irrigação 40
Figura 4	Teor de nitrogênio mineral do solo, nos estádios V2, V5 e R2 referentes ao ano agrícola de 2000/2001 (a) e V2, V5, R2 e R8 referentes ao 2002/2003 (b) 41
Figura 5	Correlação entre massa de nódulos das parcelas inoculadas e nitrogênio mineral do solo sob cultivo de soja. Nodulação avaliada no estágio V5 e nitrogênio mineral no V2. Dados do ano agrícola de 2000/2001..... 42
Figura 6	Correlação entre massa de nódulos das parcelas inoculadas e nitrogênio mineral do solo sob cultivo de soja. Nodulação avaliada no estágio V5 e nitrogênio mineral no V2. Dados dos blocos de adubação mineral com e sem irrigação do ano agrícola de 2002/2003..... 43
Figura 7	Correlação entre produção de grãos e N mineral do solo sob cultivo de soja. Os dados de N mineral do solo referem-se aos seguintes estádios fenológicos da cultura da soja: (a,d) V2, (b,e) V5 e (c,f) R2. Os dados de produção de grãos referem-se aos seguintes anos agrícolas: (a,b,c) 2000/2001 e (d,e,f) 2002/2003..... 44

LISTA DE APÊNDICES

	página
Apêndice 1 Atributos químicos de um PVd (camada de 0-20cm) submetido a adubação mineral (com e sem irrigação) e orgânica, em três sistemas de preparo do solo. Amostragem efetuada após a colheita da soja (maio/2001).....	57
Apêndice 2 Análise química da cama de aviário	58
Apêndice 3 Precipitação e ETo-evapotranspiração de referência determinados no período de julho a junho dos anos agrícolas 2000/2001 (a) e 2002/2003. ETo calculada pela equação de Penman	59

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) destaca-se pela sua importância econômica na produção de grãos e pela sua capacidade de se associar simbioticamente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*. Estas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N₂), permitindo dispensar totalmente a adubação nitrogenada para o desenvolvimento da cultura, além de beneficiar as culturas em sucessão. Adicionalmente, o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) permite a redução dos impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados, possibilitando a sustentabilidade dos sistemas de produção com relação à necessidade de nitrogênio.

Para que a fixação do nitrogênio ocorra, é necessário que as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* estejam presentes no solo, junto à semente da soja, vindo a formar nódulos nas raízes e fixando eficientemente o N₂. Este processo é viabilizado pela prática da inoculação.

Muitos fatores interferem na resposta à inoculação da soja em termos de alteração na produção de grãos. Fatores bióticos, como sinergismo ou antagonismo com outros representantes da biota do solo e com o próprio rizóbio, e fatores abióticos como pH, disponibilidade de nutrientes, umidade, temperatura e estrutura física do solo.

A soja é cultivada em diferentes sistemas de manejo e preparo do solo. O manejo pode variar com relação à adubação, irrigação, controle de plantas daninhas e moléstias. Além disso, pode variar de acordo com os sistemas de preparo do solo, como plantio direto, preparo reduzido e plantio convencional.

Portanto, sistemas de manejo do solo afetam diferentemente os fatores que interferem na FBN. O sistema de manejo que reduz a ação destes

fatores é o que apresenta a maior resposta à inoculação, em termos de produção de grãos e sobrevivência do rizóbio.

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- a) Avaliar em experimento de campo, tratamentos que diferem em relação ao preparo, adubação, irrigação do solo e inoculação da semente;
- b) Avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre o teor de nitrogênio mineral do solo, a nodulação, a produção de matéria seca e o nitrogênio total do tecido da parte aérea da planta, além da produção e do teor de nitrogênio dos grãos;
- c) Verificar o efeito do teor de nitrogênio mineral do solo sobre a resposta à inoculação (nodulação e produção de grãos);
- d) Avaliar a sobrevivência e a competitividade das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, além da necessidade da reinoculação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

2.1.1 Origem e dispersão da soja

A soja é uma das mais antigas plantas cultivadas no mundo, havendo relatos na literatura sobre seu cultivo há mais de cinco mil anos (Hymowitz, 1970). O provável centro de origem desta cultura é o Leste da Ásia, considerado como o seu centro genético primário a região Central da China e a Manchúria como o seu centro genético secundário (Costa, 1996).

A introdução da soja na América do Sul é datada do final do século XIX e, no Brasil, desde 1882 já existiam relatos sobre o cultivo da espécie *Soja hispida* no Estado da Bahia (D'utra, 1882, *apud* Vargas & Hungria, 1997). Em 1892 iniciaram-se os primeiros testes de adaptação com a cultura no Instituto Agrônomo de Campinas, cujas pesquisas foram responsáveis posteriormente pela “tropicalização da soja” (Freire & Verneti, 1999), cabendo também ao IAC o pioneirismo em pesquisas sobre isolamento e seleção de estirpes de rizóbio no Brasil (Hungria et al., 1994).

O Estado do Rio Grande do Sul impulsionou a produção da soja, em escala comercial na década de 40, com o estabelecimento do programa oficial de incentivo à triticultura, por ser a soja a melhor alternativa para sucessão do trigo no período do verão (Magalhães, 1981). A partir de 1950, a área plantada com soja continuou a se expandir no país com a inclusão dos Estados de Santa Catarina e Paraná e, após se estabelecer na região Sul, a soja se disseminou para outras regiões do território nacional. Durante a década de 70, devido a programas de incentivos e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, a soja se estabeleceu na Região do Planalto Central Brasileiro como cultura dominante (Vargas & Hungria, 1997). Atualmente, a soja é cultivada em

uma área de 18 milhões de hectares, sendo responsável por uma produção de mais de 51 milhões de toneladas de grãos, o que torna o Brasil o segundo maior produtor mundial (IBGE, 2003).

No Brasil, a transição da soja de lavoura doméstica ao cultivo comercial tornou-se possível graças ao trabalho pioneiro de pesquisadores que, através do melhoramento genético das variedades melhor adaptadas às novas condições edafoclimáticas de cultivo, em conjunto com programas de seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico, contribuíram para a sua expansão ao nível nacional. Atualmente, a soja é uma das culturas que apresenta maior relevância no cenário agrícola mundial, não apenas pelo valor bruto de seus grãos, mas sobretudo pelo valor dos produtos agregados à sua produção (Embrapa, 2002).

2.1.2 Taxonomia e descrição botânica da espécie *Glycine max*

Embora na usual classificação sistemática a soja seja classificada como pertencente à família *Leguminosae*, alguns taxonomistas a classificam como pertencente à subfamília *Fabaceae*, adotando a proposta sugerida por Delorit & Gunn (1986) *apud* Hungria et al. (1994), que subdivide a família *Leguminosae*, criando a subfamília *Fabaceae*, na qual a soja estaria incluída.

A espécie *Glycine max* destaca-se dentro do gênero *Glycine*, devido à sua importância econômica e elevado valor nutricional. Na descrição botânica geral a espécie *Glycine max* é uma planta herbácea anual, que apresenta caule ereto, ramificado e piloso, normalmente com a altura variando de 30 a 150 cm. As folhas primárias são unifolioladas e opostas e as demais folhas são trifolioladas e pinadas. Apresenta pequenas flores reunidas em cachos curtos com coloração branca, rosada ou violácea, que uma vez polinizadas originam vagens oblongadas e pilosas, com uma a cinco sementes. As sementes são lisas, ovóides ou globosas, possuindo hilo quase sempre castanho, mas cuja coloração varia de acordo com a variedade. O sistema radicular tem forma de raiz pivotante com numerosas raízes laterais (Gomes, 1990).

2.1.3 Características gerais da espécie *Glycine max*

A soja apresenta duas fases de desenvolvimento: a fase vegetativa e a fase reprodutiva. A completa maturação da soja pode variar de 75 dias, para

as variedades precoces, a 200 dias, para as variedades tardias (Vargas et al., 1997). No Brasil, a soja é classificada em quatro grupos de maturação: precoce, semiprecoce, tardia e semitardia e, dependendo da região onde a soja é cultivada, uma quinta classificação pode ser incluída, a de média maturação (Embrapa, 1993).

A necessidade total de água na cultura da soja varia entre 450 e 800mm, dependendo das condições climáticas, do manejo da cultura e da duração do ciclo (Embrapa, 2002). Embora esta leguminosa seja considerada como tolerante ao estresse hídrico, é nos períodos de germinação-emergência e floração-enchimento dos grãos que a disponibilidade de água torna-se extremamente importante para o seu desenvolvimento. Na fase da germinação-emergência, o teor de água no solo deve ficar na faixa de 50-85% do total máximo de água disponível, pois tanto o excesso quanto o déficit de água são prejudiciais à obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas e ao estabelecimento da simbiose *Bradyrhizobium*/leguminosa (Embrapa, 2002).

O desenvolvimento da soja ocorre em uma ampla faixa de temperatura (20-30°C). Entretanto, tem sido relatado que temperaturas elevadas ocasionam distúrbios sobre a floração e a maturação, enquanto que as temperaturas mais baixas reduzem ou paralisam o crescimento vegetativo (Embrapa, 2002).

A adaptação de diferentes cultivares a determinadas regiões climáticas depende, além das exigências hídricas e térmicas, de sua exigência fotoperiódica. A soja é considerada uma planta de dias curtos. Assim, em função dessa característica, é determinada a faixa de adaptabilidade de uma cultivar, sendo a sensibilidade ao fotoperíodo uma característica variável entre cultivares (Vargas & Hungria, 1997).

Dentre os elementos mais exigidos para a nutrição da soja estão o nitrogênio e o potássio, seguidos dos elementos cálcio, magnésio, fósforo e enxofre. Para suprir a alta demanda de nitrogênio, tão necessário para constituição e reservatório de proteínas nos grãos, a soja recorre às formas do elemento disponíveis no solo. Como nos solos os teores deste elemento são baixos, e sendo a prática da utilização de adubos nitrogenados inviável economicamente para complementar o N fornecido pelo solo, a reposição via associação simbiótica com bactérias que apresentam capacidade de fixação do

N₂ atmosférico tornou-se a forma usual e econômica de fornecimento deste elemento para a soja (Embrapa, 2002).

2.2 O gênero *Bradyrhizobium*

2.2.1 Taxonomia do microssimbionte

O grupo de bactérias que fixam nitrogênio atmosférico no interior de nódulos em raízes de leguminosas foi, em princípio, enquadrado no gênero *Rhizobium*, sendo a denominação baseada, essencialmente, na interação seletiva do hospedeiro, de acordo com os chamados grupos de inoculação cruzada (Fred et al., 1932 *apud* Bangel, 2000). A partir do reconhecimento dos grupos de inoculação cruzada, as bactérias responsáveis pela nodulação da soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum*. Devido às limitações do método da infecção em plantas e às diferenças existentes nas espécies pertencentes a este gênero, tornou-se evidente que os rizóbios consistiam em um grupo de bactérias bastante diverso, o que levou posteriormente a sua divisão em dois grupos, um de crescimento rápido e outro de crescimento lento, embora a divisão do gênero *Rhizobium* em duas classes, de acordo com o tempo de geração, já houvesse sido sugerida por Lohnis & Hansen (1921) *apud* Santos (1998).

Jordan (1982), ao reclassificar algumas espécies de rizóbios baseando-se em características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas para diferenciá-las, separou as que apresentavam crescimento lento em um novo gênero, denominado *Bradyrhizobium*. Entre as espécies reclassificadas por Jordan (1982), estava a espécie *R. japonicum*.

Na década de 80 e início da década de 90, vários trabalhos começaram a demonstrar que existia grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* (Hollis et al., 1981; Stanley et al., 1985; Minamisawa et al., 1990). Inicialmente, estudos desenvolvidos por Hollis et al. (1981) com diversas espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* usando técnicas de hibridização de DNA-DNA, demonstraram que as estirpes de *B. japonicum* poderiam ser divididas em dois grupos principais de homologia de DNA (Stanley et al., 1985).

As diferenças genéticas inicialmente demonstradas por Hollis et al. (1981) na espécie *B. japonicum*, originaram novos estudos buscando

correlacionar características fenotípicas e genéticas relatadas nos grupos I e II nesta espécie (Huber et al., 1984; Kuykendall et al., 1988; Minamisawa, 1990; Minamisawa & Fukai, 1991). Os resultados obtidos nestes estudos levaram Kuykendall et al. (1992), a sugerirem a subdivisão de *B. japonicum* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I (I e Ia) e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II, sendo esta nova nomenclatura aceita e validada pelo International Journal of Systematic Bacteriology a partir de 1993.

Em um trabalho realizado por Rumjanek et al. (1993), baseado na análise de alguns parâmetros, como assimilação da amônia pela glutamina sintetase (GS) *in vitro* e hibridização com a sequência 16S rRNA, as duas principais estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5019 e a SEMIA 587) recomendadas para inoculantes, foram definidas como membros da espécie *B. elkanii*. Lunge (1993), através de um estudo com onze oligonucleotídeos iniciadores arbitrários e análise de RAPD, observou que algumas estirpes "brasileiras" diferenciavam-se, embora não tenha sido feita nenhuma correlação com a divisão em genótipos ou espécies. Análises posteriores utilizando técnicas de PCR (Sato, 1999) e características fenotípicas (Lemos, 1994; Bodey & Hungria, 1995) constataram a existência de dois agrupamentos envolvendo as quatro estirpes "brasileiras", o primeiro formado pelas estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e o segundo formado pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. Atualmente, as estirpes de bradirrizóbios que nodulam a soja e que são recomendadas para produção de inoculantes no Brasil, são classificadas como *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019).

2.2.2 Características gerais do gênero *Bradyrhizobium*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* se caracterizam por apresentar crescimento lento, tempo de geração de 7 a 13 horas e alcalinização do meio de cultivo levedura-manitol, contendo azul de bromotimol como indicador de pH. Os bradirrizóbios são predominantemente aeróbios e quimiorganotróficos, também não esporulam, são Gram-negativos e possuem a forma de bastonete, com tamanho variável de 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm , sendo a sua mobilidade dada por um flagelo polar ou subpolar. Grânulos de poli- β -hidroxibutirato são encontrados com frequência no interior das células. A

temperatura ótima para o seu crescimento ocorre entre 25 e 30°C e em meio de cultivo levedura-manitol apresentam colônias brancas, circulares, convexas e opacas, raramente translúcidas, tendendo a ser granulares na textura, seu tamanho não excede a um milímetro de diâmetro para um período de incubação de 5 a 7 dias. As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas tropicais e temperadas (Somasegaran & Hobben, 1994; Holt et al., 1994).

2.3 Inoculação das sementes de soja

2.3.1 Tipos de inoculantes

Os inoculantes turfosos predominam no Brasil, cuja origem está na coleta de solos aluviais orgânicos e ácidos. Estes são peneirados e corrigidos com calcário, visando elevar o pH para próximo da neutralidade. A produção do inoculante ocorre em caldo bacteriano, que é injetado na dose de 50 mL para cada 150g ou 200g de turfa peneirada. Existem inoculantes turfosos à base de turfa esterilizada, que proporcionam maior qualidade ao produto. Esta esterilização, em geral, é feita por irradiação (Câmara, 1998). Segundo Brockwell et al. (1995), inoculantes esterilizados (radiação gama) são preferidos e usados em países como Austrália e Estados Unidos, pois eles contêm até 100 vezes mais rizóbio que a turfa não esterilizada.

A oferta de outros tipos de inoculantes vem crescendo. Já são encontrados no mercado inoculantes líquidos e formulações à base de pó molhável. O inoculante líquido é apenas um substrato líquido, onde se encontram as bactérias. O pó molhável consiste em produto contendo bactérias liofilizadas em substrato sólido (Câmara, 1998).

Pela atual legislação brasileira, o número mínimo de células bacterianas que um inoculante deve conter é de $1,0 \times 10^8$ células por grama ou por mililitro de inoculante, até o prazo final de validade do produto. Esta concentração equivale à quantidade mínima de inoculante que deve ser misturada a um saco de 50 kg de sementes de soja para proporcionar, no mínimo, 80.000 células bacterianas por semente de soja (Vargas et al., 1997).

2.3.2 Procedimentos e dosagens

A operação de inoculação deve ser dimensionada e programada para evitar desperdícios. O ambiente de inoculação deve ser ventilado e sombreado. Deve-se evitar uso de sacos de fertilizantes como recipiente para inoculação, pois a concentração salina residual presente nestes sacos é suficiente para matar as bactérias. Para que ocorra o devido contato e aderência do inoculante sobre a superfície da semente, a operação deve ser feita na dosagem certa, promovendo a mistura de forma manual ou mecânica (tambor metálico, com eixo excêntrico). Utilizar 300 mL de água açucarada (10%) para umedecer todas sementes e adicionar 400 g de inoculante por saco de semente, todas sementes devem estar recobertas pelo inoculante (Câmara, 1998).

2.4 Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N₂

Muitos fatores podem interferir na nodulação e na fixação do N₂. Os efeitos e recomendações para alguns fatores são apresentados na Tabela 1.

2.4.1 Qualidade do inoculante

O inoculante deve ser adquirido de empresas idôneas e apresentar na embalagem a identificação das estirpes, a concentração de células bacterianas, o prazo de validade e o número do seu registro no Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Câmara, 1998).

Keyser et al. (1992) descreveu as propriedades de um bom suporte para inoculante:

- alta capacidade de retenção de água;
- não-tóxico para o rizóbio;
- fácil esterilização por autoclavagem ou irradiação gama;
- matéria prima disponível e barata;
- suficientemente adesivo para aplicação efetiva na semente;
- capacidade de tamponamento do pH;
- capacidade de troca de cátions.

TABELA 1. Fatores que interferem na fixação biológica do nitrogênio: síntese de alguns fatores que limitam a fixação biológica do nitrogênio e possíveis recomendações (Adaptado de Montañez, 2000)

Fatores que afetam FBN	Efeito	Recomendações
Temperatura & umidade	<ul style="list-style-type: none"> * Sobrevivência do rizóbio no solo¹ * Nodulação e fixação do nitrogênio^{2 3} * Inibição da fixação.⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> * Colocar o inóculo em camadas de solo mais profundas, quando a camada do topo apresenta temperaturas elevadas.⁵ * A cobertura do solo pode conservar umidade e reduzir a temperatura do solo.⁵
Fertilização Nitrogenada	<ul style="list-style-type: none"> * Geralmente o nitrogênio combinado reduz ou inibe a nodulação e a fixação do nitrogênio. Devido a este efeito, geralmente recomenda-se a não utilização de fertilizante nitrogenado em leguminosas. Entretanto o fertilizante nitrogenado é utilizado em culturas consorciadas ou em rotação com cereais, o que pode afetar a fixação do nitrogênio das leguminosas.⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> * O nitrogênio mineral tem pouco efeito sobre o desenvolvimento de leguminosas de grãos, a menos que se aumente a eficiência do uso do nitrogênio disponível.⁶ * É possível que pequenas quantidades de fertilizante nitrogenado permitam aumento do rendimento sem que ocorra a redução da quantidade de nitrogênio fixado.^{7,8}
Pesticidas, fungicidas e inseticidas	<ul style="list-style-type: none"> * A compatibilidade entre rizóbio e pesticidas é pouco compreendida, exceto para fungicidas.^{9 10} * Os inseticidas não apresentam efeito sobre a nodulação se este não for aplicado diretamente sobre a semente. * O efeito de herbicidas sobre a sobrevivência do rizobio não é conhecido. 	<ul style="list-style-type: none"> * Há uma variabilidade muito grande de efeitos, o que se recomenda é testar o efeito da utilização de determinado agroquímico para cada inoculante. * O efeito do pesticida sobre a fixação do N pode ser minimizado se não existir um contato direto entre eles.
Culturas Consorciadas	<ul style="list-style-type: none"> * Aumento da oportunidade de uso do nitrogênio ciclado, reduzindo a necessidade de insumos nitrogenados, por aumentar a disponibilidade do N no solo ou pela transferência do N. 	<ul style="list-style-type: none"> * A quantidade total de nitrogênio fixado por área em culturas consorciadas é geralmente pequena devido ao decréscimo da densidade populacional da leguminosa, e o aumento da competição por luz e nutrientes da não-leguminosa. O aumento da quantidade de nitrogênio fixado pode ocorrer se a leguminosa consorciada utilizar eficientemente os recursos limitados (for mais agressiva)¹²
Acidez do solo	<ul style="list-style-type: none"> * Solos ácidos reduzem a produção agrícola e a fixação do nitrogênio 	<ul style="list-style-type: none"> * Utilizar cultivares e <i>Rhizobium</i> tolerantes a solos ácidos * Uso de calagem para atingir um pH no qual elimina-se o alumínio e o manganês tóxico.
Preparo	<ul style="list-style-type: none"> * Quando o preparo é minimizado, determinam-se baixas taxas de mineralização e nitrificação, associado com aumento da imobilização do N e alto potencial de denitrificação o que determinará um decréscimo no N disponível 	<ul style="list-style-type: none"> * A redução do preparo pode estimular a demanda e a fixação do N₂. Preparo reduzido ou plantio direto estimulam a fixação do N₂ e determinam um novo equilíbrio entre a taxa de entrada dos resíduos e a taxa de decomposição.¹¹

¹ Bowen & Kennedy (1959); ² Hardarson & Jones (1979); ³ Montañez et al. (1995); ⁴ Hungria & Franco (1993); ⁵ Roughley (1980); ⁶ Hardarson et al. (1991); ⁷ Boote et al. (1978); ⁸ Poole et al. (1983); ⁹ Ramos et al. (1993); ¹⁰ FAO (1984); ¹¹ Van Kessel & Hartley (2000)

Apesar de muitos destes critérios serem atendidos pela turfa, a pesquisa por novos materiais, que possam ser utilizados como suporte para inoculantes, deve continuar, particularmente em países que não têm depósitos de turfa.

Para que ocorra uma boa colonização da rizosfera das plântulas de soja, é necessário que se tenha estirpes de rizóbio eficientes e um ótimo suporte para inoculação. Deseja-se que o número de bactérias seja o maior possível no momento da germinação. Para que isso ocorra, é necessário que o inoculante tenha alto número de rizóbio viável (inoculante de alta qualidade), ou se utilize maior dosagem de inoculante para compensar as perdas entre a inoculação da semente e a nodulação efetiva (Brockwell et al. 1995).

2.4.2 Elementos edafo-climáticos

Entre os principais fatores que restringem a resposta da soja à inoculação, destacam-se a acidez do solo e fatores relacionados, competição por sítios de nodulação entre as estirpes presentes no inoculante e as já estabelecidas no solo e grande mortalidade do inóculo junto à semente na semeadura durante períodos de alta temperatura e baixa umidade do solo (Freire & Vidor, 1971; Munns, 1977; Keyser & Munns, 1979; Vidor, 1981; Morote et al., 1990).

Solos ácidos e com baixa fertilidade são comuns nas áreas de produção e, frequentemente, apresentam concentrações tóxicas de alumínio e, em alguns casos, manganês (Lal, 1993). Tais condições de solos ácidos podem determinar problemas para a planta, a bactéria e a simbiose (Giller and Wilson, 1993). O microsimbionte geralmente é a parte mais sensível ao efeito do pH. Há variação entre espécies e entre estirpes, quanto à tolerância à acidez (Lowendorff, 1981; Vargas and Graham, 1988; Brockwell et al., 1995; Hungria et al., 1997). O pH ótimo para o crescimento fica entre 6,0 e 7,0 (Jordan, 1984), poucos rizóbios apresentam bom desenvolvimento em pH abaixo de 5,0 (Graham et al., 1994). Exceções incluem estirpes de *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium* sp. Particularmente *Sinorhizobium meliloti* é descrito como altamente sensível à acidez (Brockwell et al., 1995), mas variações na tolerância a pH ácido foram descritas para estas espécies (Graham et al., 1994).

A temperatura é outro importante fator que interfere na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Referências encontradas na literatura indicam que temperaturas de solo superiores a 35°C, comumente encontradas em regiões produtoras de soja, determinam baixa nodulação, principalmente se as estirpes utilizadas não são aptas para tal condição (Munévar & Wollum, 1981). Temperatura de solo situada entre 25 e 35°C são apontadas como adequadas para boa nodulação e fixação do nitrogênio em leguminosas tropicais (Norris & Date, 1976). Galleti et al. (1971) demonstraram que temperaturas em torno de 33°C prejudicam a iniciação dos nódulos e a eficiência fixadora de nitrogênio em soja, sendo a temperatura de 27°C considerada a ideal para estes dois fatores. Segundo Pankhurst & Sprent (1976), a maior atividade da nitrogenase ocorre entre 19 e 30°C, com decréscimo acentuado fora destes limites.

Assim como a acidez e a temperatura, o estresse hídrico é um importante fator de interferência na FBN. O estresse hídrico interfere no crescimento e sobrevivência do rizóbio, na formação e longevidade dos nódulos, na síntese de leghemoglobina e nas funções do nódulo. Estresse severo por falta da água pode levar a interrupção irreversível da fixação do N₂ (Sprent, 1971; Vincent, 1980; Walker and Miller, 1986; Venkateswarlu et al., 1989; Stamford et al., 1990; Guerin et al., 1991).

Algumas estratégias para reduzir os efeitos da acidez, de temperaturas altas e ressecamento do solo são reportadas na literatura. Existem diferenças fisiológicas entre espécies de plantas, espécies de rizóbios e estirpes em relação a temperatura, estresse hídrico e acidez. Tais diferenças podem ser consideradas em programas de melhoramento de rendimento de leguminosas em áreas sujeitas a estes estresses (Karanja and Wood, 1988).

Câmara (1998) afirma que o desempenho da FBN é melhor quando o solo está próximo da neutralidade. Solos ácidos podem ser corrigidos por meio de calagem, a qual, além de corrigir a acidez do solo, fornece cálcio para o crescimento radicular, magnésio para a molécula de clorofila e a produção de fotoassimilados, melhorando ainda, a absorção de fósforo (ATP) e potássio.

Uma das formas de reduzir a temperatura do solo é a manutenção de palha na superfície, que ainda ajuda reter umidade promovendo melhores condições à nodulação da soja e protegendo o solo contra a erosão (Derpsch et al., 1991; Bragagnolo, 1986; Voss & Sidiras, 1985).

2.4.3 Nitrogênio mineral

De forma geral, é aceito que todas as formas de nitrogênio mineral influenciam negativamente a FBN e mostram efeito sobre diversos aspectos da simbiose leguminosa/(brady)rhizobium (Streeter, 1988). Altas concentrações de NH_4^+ ($\geq 1,0$ mM) tem efeito negativo sobre número e peso de nódulos e atividade da nitrogenase em várias espécies de leguminosas (Dart & Wildon, 1970; Guo et al., 1992). Além disto, a repressão da indução do gene regulatório *nodD* e genes *nodABC* são dependentes da concentração de amônio em *Bradyrhizobium japonicum* (Wang & Stacey, 1990). Exudação de flavonóides responsáveis pela sinalização (Cho & Harper, 1991; Wojtaszek et al., 1993) e pela infecção das bactérias nas raízes (Dazzo & Brill, 1978) também são afetados por NH_4^+ . Entretanto, existem trabalhos demonstrando tanto efeitos positivos quanto negativos do NH_4^+ sobre a nodulação, em simbiose com leguminosas (Dart & Wildon, 1970; Svenning et al., 1996).

Surpreendentemente, segundo Gulden & Vessey (1997) há poucos trabalhos reportando o efeito do NH_4^+ na nodulação e fixação do N_2 na soja (*Glycine max* [L.] Merr.) em condições controladas. Na presença de altas concentrações de NH_4^+ (5,5 mM), a nodulação foi completamente inibida na cultivar de soja Bragg (Carroll et al., 1985). Imsande (1986) reporta que a exposição sequencial da cultivar Harosoy a 0,5 mM NO_3^- e 4,0 mM NH_4^+ reduziu a nodulação em 37% quando comparada a plantas que foram constantemente expostas à 0,5mM NO_3^- .

2.4.4 Preparo do solo

A intensa mobilização do solo, causada pela aração e gradagens no plantio convencional, leva a redução dos teores de matéria orgânica e aumenta os riscos de erosão, especialmente nos trópicos. A diminuição do preparo do solo (PD), associada à cobertura com palha, aumenta a estabilidade dos agregados e estrutura do solo, reduz os riscos de erosão hídrica, diminui a amplitude térmica e mantém a umidade do solo e, com tempo, aumenta o teor de matéria orgânica (Blevins et al., 1977; Kember & Derpsch, 1981; Pavan et al., 1985). Diversos estudos têm indicado que o sistema PD aumenta a biomassa do solo e a diversidade microbiana (Powlson & Jenkinson, 1981; Staley et al., 1988; Alvarez et al., 1995).

Os dados da literatura têm demonstrado que o sistema de manejo e preparo do solo PD, associado à rotação de culturas, favorece a população de Bradyrizóbio, a nodulação, a fixação do N₂ e a produção de grãos (Voss & Sidiras, 1985; Hungria & Stacey, 1997; Hungria et al., 1997). Segundo Kessel (1999), no sistema de preparo PD ocorre a redução do nitrogênio disponível e o aumento da umidade do solo, o que determina um aumento do potencial da fixação biológica do nitrogênio.

2.4.5 Sobrevivência e competitividade nodular

A competitividade nodular é definida como a habilidade de uma ou mais estirpes de *Bradyrhizobium* ocupar a maior parte dos nódulos da leguminosa hospedeira, quando inoculadas em mistura com outras estirpes (Trinick, 1982).

Na complexa interação entre rizóbios e leguminosas, a competição por sítios de infecção envolve várias características inerentes à leguminosa e ao rizóbio, tais como: a influência do hospedeiro no processo de infecção; a concentração de células de rizóbio presentes no inóculo ou próximas à semente; a taxa relativa de crescimento das estirpes competitivas; o estado fisiológico do rizóbio na hora da inoculação; variáveis ambientais (temperatura, umidade, pressão de oxigênio) e nível nutricional da planta hospedeira (Trinick, 1982; Vargas et al., 1994). Embora alguns destes fatores possam afetar diretamente a competitividade, em sua maioria o efeito é direcionado sobre a persistência e sobrevivência das estirpes inoculadas, influenciando somente indiretamente as interações competitivas (Sadowsky, 2000).

A forma como uma estirpe pode utilizar um composto presente na rizosfera que não seja facilmente utilizado por outras estirpes pode se constituir em uma vantagem para seu crescimento e, conseqüentemente, para sua competitividade. As rizopinas são compostos derivados de inositol, sendo sintetizados e catabolizados por aproximadamente 10% das estirpes de *Rhizobium*. Os genes necessários ao seu catabolismo (*moc*) e síntese (*mos*) estão ligados a plasmídeos simbióticos. A capacidade de utilização das rizopinas como fonte de carbono pode significar uma vantagem competitiva sobre outros microrganismos presentes na rizosfera. Em *Sinorhizobium meliloti*, estirpes que catabolizam rizopinas (*Moc*⁺) foram dominantes na ocupância

nodular sobre estirpes mutantes (*Moc⁻*). Assim, a utilização de estirpes com fenótipo *Mos⁺/Moc⁺* poderia se tornar uma boa estratégia para aumentar a competitividade em estirpes utilizadas em inoculantes (Heinrich et al., 1999).

De acordo com Weaver & Frederick (1974), a maior ocorrência de uma estirpe nos nódulos, quando em mistura com estirpe de capacidade semelhante, pode ser favorecida por diferenças em concentrações de células entre as duas estirpes presentes no inoculante ou na rizosfera, tendo os autores afirmado que as células bacterianas do inoculante devem apresentar uma vantagem numérica pelo menos 1000 vezes maior do que o número de bactérias existentes no solo para que sejam formados 50% dos nódulos pela estirpe inoculada.

Peres & Vidor (1980), estudando o efeito de diferentes concentrações entre duas estirpes competitivas (BR 29 e BR 96), observaram uma maior taxa de ocupação nodular proporcionada pela estirpe presente em maior concentração no inóculo. Assim, segundo Vidor et al. (1979), poderia haver uma atuação seletiva sobre uma determinada estirpe de rizóbio, fazendo com que a estirpe menos sensível apresente maior oportunidade de infecção da superfície radicular do hospedeiro e, como conseqüência, haveria uma maior porcentagem de nódulos formados pela estirpe que se encontrava em maior concentração no inoculante.

A rapidez para o início da nodulação pode interferir na competitividade entre estirpes co-inoculadas, sendo atribuída uma menor taxa de ocupação nodular para as estirpes que apresentem menor rapidez para iniciar a nodulação (Mcderermott & Graham, 1989). Em *B. japonicum*, variações observadas na capacidade competitiva de estirpes não têm sido correlacionadas à velocidade de início da nodulação, uma vez que foi demonstrado que estirpes competitivas (USDA 110 e USDA 1028) apresentaram a mesma velocidade de nodulação que outras estirpes menos competitivas (Smith & Wollum II, 1989).

A taxa de adesão bacteriana ao sistema radicular do hospedeiro pode garantir vantagem competitiva de uma estirpe em relação à outra (Vésper & Bauer, 1985). A adsorção do rizóbio às raízes do hospedeiro tem sido relatada em *B. japonicum* (Lodeiro & Favelukes, 1999), *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium meliloti* (Diaz et al., 1989 *apud* Lodeiro et al., 2000), tendo sido

atribuída à presença de lecitinas radiculares que atuam no reconhecimento do rizóbio, interagindo com os polissacarídeos da superfície celular bacteriana e conferindo ao processo de adesão alguma especificidade (Havelson & Stacey, 1986).

A inclusão das lecitinas entre os determinantes de especificidade hospedeira se baseia no estudo desenvolvido por Diaz et al. (1989), onde plantas de trevo transgênicas para o gene lecitina, puderam nodular com *R. leguminosarum* bv *viciae*, espécie de rizóbio que normalmente não nodula trevo. Um outro exemplo do envolvimento de lecitinas no processo de adesão se refere a trifolina, uma lecitina sintetizada por diversas leguminosas que poderia estar envolvida no processo de reconhecimento e aderência de *R. leguminosarum* bv *trifolii* em trevo, tendo o mecanismo proposto para esta interação resultado provavelmente da aglutinação entre proteína e bactéria, formando sítios receptores para a infecção (Freire, 1992). Embora existam evidências do envolvimento das lecitinas no processo de adesão, sua síntese, segundo Ho et al. (1990), tem origem bacteriana e não vegetal, como se pensava em princípio. Os autores se baseiam em estudos onde foi possível observar que uma lecitina constituída de sacarídeos de D-galactose e lactose, denominada de Bj38, foi sintetizada apenas por *B. japonicum*.

Apesar da mobilidade e da quimiotaxia não serem consideradas essenciais à nodulação (Caetano-Anolles et al., 1988), tem sido observado que mutantes sem mobilidade tem sua habilidade competitiva reduzida, conforme relatado por Liu et al. (1989) em relação a um mutante Tn7 sem mobilidade de *B. japonicum*, que mostrou menor competição nodular em relação à estirpe parental. Células rizobianas muitas vezes movem-se sobre a superfície radicular do hospedeiro antes da adesão e esta mobilidade pode influenciar a habilidade competitiva de determinada estirpe.

De acordo com Sadowsky (2000), alterações ou deleções de genes controladores de características da superfície celular influenciam a habilidade competitiva de nodulação. Bhagwat & Keister (1991) observaram a perda da capacidade competitiva em mutantes de *B. japonicum* deficientes na produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos. Contudo, após a inserção de genes necessários à síntese dos polissacarídeos, foi restaurada a capacidade competitiva e de nodulação, tornando-os semelhantes à estirpe parental.

A partir dos estudos realizados com variantes de estirpes noduladoras de soja do sorogrupo SEMIA 566 (Boddey & Hungria 1994), foi constatado que diferenças na capacidade competitiva estariam relacionadas com a habilidade de alterar as proteínas da membrana em resposta ao estímulo das raízes (Scotti et al., 1993).

Nishi et al. (1996), ao analisarem os parâmetros relacionados aos fenótipos radiculares em soja inoculada com a estirpe SEMIA 566 e sua variante CPAC 15 (SEMIA 5079), verificaram que existiam diferenças quanto ao número de pêlos radiculares, o que, segundo os autores, poderia estar relacionado a uma maior capacidade competitiva das estirpes.

A competição por sítios de infecção também pode ser influenciada pela presença de outras estirpes através da produção de compostos tóxicos a outras espécies ou estirpes específicas de rizóbio (De Antoni et al., 1981).

Genes que codificam a produção de fatores antibióticos tem sido responsáveis por conferir aumentos de competitividade (Triplett & Sadowsky, 1992). Embora genes equivalentes não tenham sido encontrados em bradirrizóbios, genes codificadores de antibióticos, como a trifolitoxina, presentes em *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* tem aumentado a competitividade de *R. etli* e provavelmente em outros rizóbios do solo (Triplett & Barta, 1987).

A produção de bacteriocinas tem sido apontada como determinante da maior competitividade de uma estirpe em relação à outra. Estudos com o uso de estirpes isogênicas têm mostrado a vantagem competitiva das estirpes produtoras de bacteriocina sobre estirpes sensíveis. Hudgson et al. (1985) observaram que a estirpe CB 782 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* produtora de bacteriolisina, quando co-inoculada com estirpes sensíveis a esta toxina, resultou em maiores percentuais de ocupação dos nódulos pela estirpe CB 782. Os autores sugerem que a produção de bacteriolisina por uma estirpe de rizóbio poderia torná-la mais competitiva por sítios de infecção em relação às estirpes sensíveis.

A produção de rizobiotoxina [2-amino-4-(2-amino-3-hidropropoxi)-*trans*-but-3-ác. enólico] por estirpes do grupo II (*B. elkanii*) em soja induz a clorose em folhas novas de cultivares sensíveis, prejudicando o crescimento das plantas (Minamisawa, 1989; Fuhrmann, 1990). Means et al. (1961),

estudando a competição entre estirpes de *B. japonicum* produtoras de rizobiotoxina (USDA 76 e USDA 94), quando inoculadas nas cultivares de soja Lee e Hawkeye, observaram que a estirpe USDA 76, quando co-inoculada com estirpes não produtoras de rizobiotoxina, foi mais competitiva, não importando a sua proporção no inóculo, uma vez que a presença de 1,1% desta estirpe no inoculante foi responsável por 85% de ocupação nodular. Esses resultados reforçam a hipótese sugerida por Minamisawa (1990), de que a produção dessa toxina seria vantajosa para a sobrevivência das estirpes produtoras, auxiliando-as na competição com outros microrganismos do solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no campo, na Estação Experimental Agronômica da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), no município de Eldorado do Sul-RS, às margens da rodovia BR 290, distante aproximadamente 65 km de Porto Alegre-RS. O local encontra-se inserido na microrregião da Depressão Central. O solo da área utilizada foi classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico.

A área escolhida nunca havia sido cultivada. Sua vegetação era de campo nativo. A primeira cultura estabelecida na área foi a soja, no ano de 2000. O experimento foi avaliado desde o primeiro ano de sua instalação, incluindo dois cultivos de soja referentes aos anos agrícolas 2000/2001 e 2002/2003. A sequência de culturas foi Soja (2000/2001), Aveia + Ervilhaca ou Trigo, Milho (2001/2002), Aveia Branca ou Aveia Preta, Soja (2002/2003).

3.1 Tratamentos

Os tratamentos estavam dispostos em parcelas que foram reunidas em blocos conforme o manejo da adubação e da irrigação. Em setembro de 2000 foi aplicado em toda área experimental, com exceção dos blocos com adubação orgânica, uma dose de 5.700 kg ha⁻¹ de calcário (PRNT de 65%), com base no índice SMP (5,9) para atingir pH 6,0, na camada de 0 a 20cm. Quatro blocos utilizaram fertilizante mineral e dois blocos fertilizante orgânico (Figura 1). A dose do fertilizante mineral e a data em que foi aplicado foram as seguintes: 280 kg ha⁻¹ de superfosfato triplo (SFT) em outubro de 2000; 220 kg ha⁻¹ de SFT em abril de 2001; 200 kg ha⁻¹ da fórmula 5-30-10 em outubro de 2001; 75 kg ha⁻¹ de SFT em abril de 2002; e 200 kg ha⁻¹ de SFT em outubro de 2002. Utilizou-se cama de aviário como fonte de adubo orgânico, nas seguintes

doses e datas em que foram aplicados: 10.000 kg ha⁻¹ em outubro de 2000; 4.200 kg ha⁻¹ em abril de 2001; e 3.400 kg ha⁻¹ em outubro de 2001. Na adubação orgânica utilizou-se cama de aviário e o manejo não contemplou nenhuma forma de agroquímico para o controle de invasoras e moléstias. Ambas as formas de adubação basearam-se nas dosagens para reposição de nutrientes e, a acidez foi corrigida baseada em análise de solo de acordo com a Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (1995).

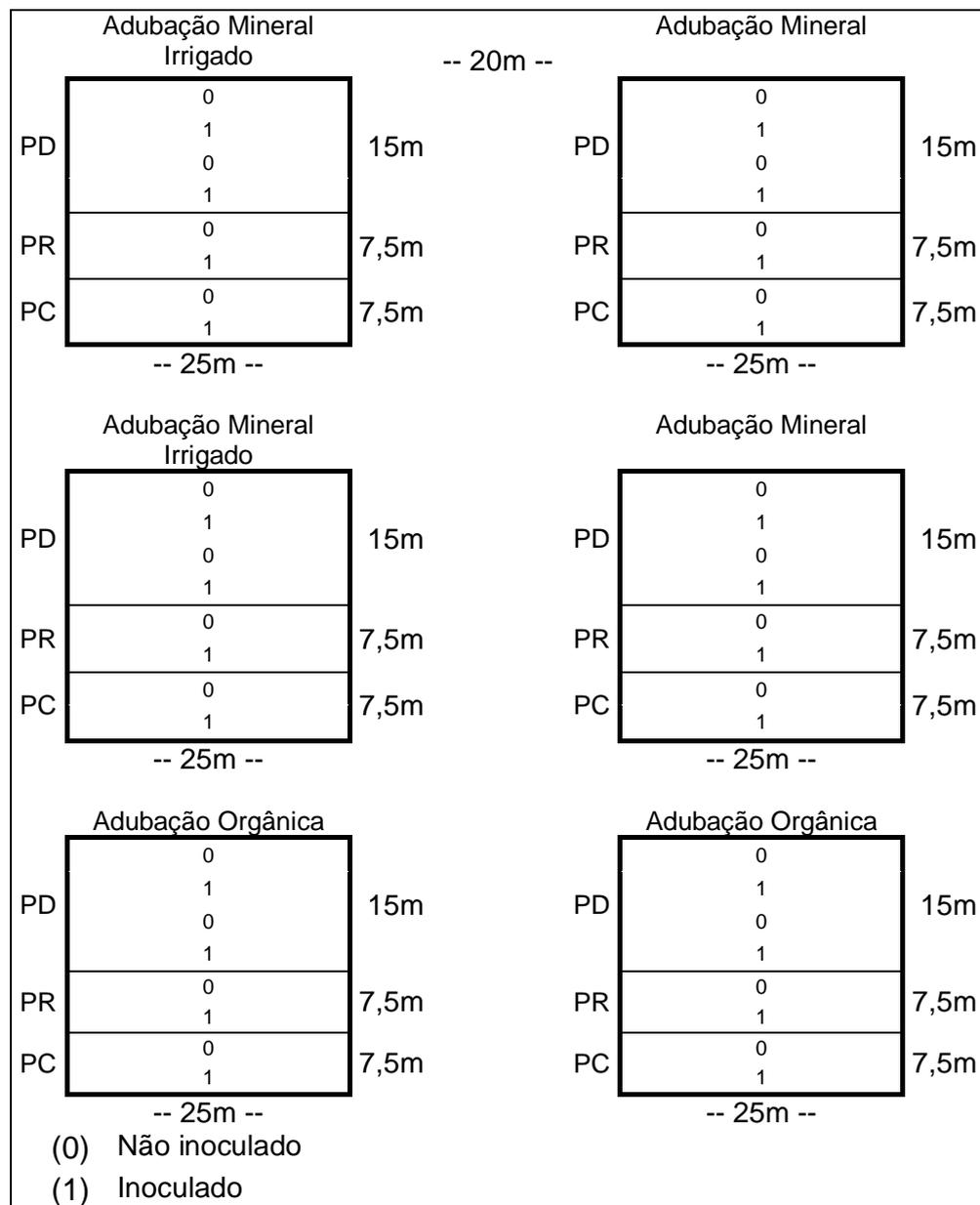


FIGURA 1. Esquema da área experimental

Adicionalmente, os tratamentos com adubação mineral foram subdivididos em dois, com e sem irrigação por aspersão. O que definiu três

grandes categorias de tratamentos (Figura 1): (i_0) adubação mineral irrigado; (i_1) adubação mineral e; (i_2) adubação orgânica. Estas categorias delimitaram três blocos, com duas repetições.

Os blocos foram dimensionados de forma que os tratos culturais fossem mecanizados, buscando reproduzir as condições de lavoura. Desta forma apresentaram dimensões de 25m x 30m e de 20m para os corredores entre os blocos.

Cada bloco foi dividido em quatro parcelas com dimensão de 7,5m x 25m. Cada uma foi subdividida, apresentando uma faixa com inoculação e outra sem inoculação. Os métodos de preparo do solo incluíram: (j_0) semeadura direta (PD) - com semeadoras específicas; (j_1) preparo mínimo (PR) - escarificação com equipamento munido de hastes com ponteiros estreitas e na profundidade de 25cm, acoplado a rolo destorroador; e (j_2) preparo convencional (PC) - arado de discos a 25cm de profundidade, seguido de duas passagens com grade niveladora de discos leve.

Quanto à inoculação, cada parcela recebeu os tratamentos: (k_0) inoculado; (k_1) não inoculado. A inoculação foi realizada utilizando-se inoculante turfoso (200g de inoculante para 50kg de sementes), cedido pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), contendo em quantidades semelhantes as estirpes SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080. Desta forma, cada bloco apresentou duas parcelas com PD, uma com PR e uma com PC.

As combinações dos tratamentos envolveram tipos de adubação, uso ou não de irrigação, métodos de preparo do solo, e uso ou não da inoculação, no caso da soja, conforme Figura 1. Estabeleceram-se 18 agrossistemas, que variaram desde os mais conservacionistas e com menor dependência de insumos externos à propriedade (adubação orgânica, semeadura direta) aos menos conservacionistas e/ou com maior uso de insumos e energia (adubação mineral com irrigação, com preparo convencional).

Adicionalmente aos tratamentos apresentados, as parcelas foram submetidas a diferentes sistemas de culturas. Para os dois primeiros anos de condução do experimento foi a seguinte: soja-trigo-milho-aveia branca-soja, no sistema rotação de culturas, e soja-aveia+ervilhaca-milho-aveia+ervilhaca-soja,

no sistema sucessão de culturas. Por se tratar de sistemas em implantação, não foram avaliados efeitos dos sistemas de culturas.

As etapas de implantação da primeira cultura (soja) sobre o campo nativo foram as seguintes: 1° demarcação das parcelas, 2° amostragem e análise de solo, 3° correção da acidez do solo, 4° dessecação do campo nativo com herbicida a base de Glifosato nas áreas sob PD e PR, 5° lavração e gradagens nas áreas sobre PC, 6° semeadura da soja. Nos anos seguintes foi dessecada a cultura de inverno nos preparos PD e PR, com exceção dos blocos com adubação orgânica, nos quais os preparos consistiram apenas de rolagem da cobertura com rolo-faca. O preparo PC teve os restos culturais incorporados durante a aração e gradagem em todos tratamentos.

3.2 Linhagens bacterianas

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e 5019) utilizadas nos ensaios ao longo da pesquisa (Tabela 2) foram cedidas pelo Centro de Recursos Microbiológicos (MIRCEN) - Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO), sendo recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*).

TABELA 2. Relação das estirpes de *Bradyrhizobium* spp utilizadas

Estirpe (SEMIA) ¹	Sinonímias	Principais características/Origem
587	BR 96	Isolada pelo IPAGRO, RS em 1967. Eficiente e competitiva (Peres, 1979), recomendada comercialmente de 1968 a 1975 e de 1979 até o momento
5019	29W, BR 29	Isolada da linhagem IAC-70-559, pela Embrapa-CNPAB, RJ. Considerada com alta (Peres, 1979), a média eficiência (Neves et al., 1985), sendo recomendada comercialmente de 1979 até o momento
5079	CPAC 15	Isolada pela Embrapa-CPAC, DF, Eficiente (Vargas et al., 1992), recomendada comercialmente a partir de 1992
5080	CPAC 7	Isolada pela Embrapa-CPAC, DF, Subcultura da CB1809. Competitiva (Vargas et al., 1992), recomendada comercialmente a partir de 1992

¹ Denominação de referência da coleção de culturas do MIRCEN – FEPAGRO

3.3 Cultivares de soja

Utilizaram-se duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. A cultivar M-Soy 6101 foi utilizada no experimento de campo em 2000/2001. A cultivar BRS – 154 foi utilizada no experimento de campo em 2002/2003 e num ensaio em casa de vegetação. Ambas as cultivares são de ciclo médio, alto potencial de produção e não apresentam problemas de acamamento.

3.4 Avaliações efetuadas

A descrição das fases fenológicas da cultura da soja é apresentada na Tabela 3. No momento das avaliações, determinou-se o estágio da cultura. Tais estádios são representados por símbolos, que foram utilizados durante as avaliações.

TABELA 3. Fases fenológicas da cultura da soja e respectivas simbologias

Símbolo	Estádio	Descrição
	Denominação	Estádio vegetativo
VE	Emergência	Os cotilédones estão acima da superfície do solo
VC	Cotilédone desenvolvido	As margens das folhas unifoliadas e opostas não se tocam
V ₁	Primeiro nó	Folhas unifoliadas desenvolvidas
V ₂	Segundo nó	Folhas trifoliadas completamente desenvolvidas no nó acima ao da folha unifoliada
V ₃	Terceiro nó	Três nós sobre a haste principal com folhas completamente desenvolvidas, iniciando-se com nós das folhas unifoliadas
V _(n)	Enésimo nó	"n" números de nós sobre a haste principal com folhas completamente desenvolvidas, iniciando-se com nós das folhas unifoliadas
Estádio Reprodutivo		
R ₁	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó da haste principal
R ₂	Florescimento pleno	Uma flor aberta no último nó da haste principal, com folha completamente desenvolvida
R ₃	Início da formação de vagens	Vagem com 0,5 cm de comprimento desenvolve-se em um dos quatro últimos nós do caule, com folha desenvolvida completamente
R ₄	Plena formação de vagens	Vagem com 2,0 cm de comprimento desenvolve-se em um dos quatro últimos nós do caule, com folha desenvolvida completamente
R ₅	Início do enchimento de grãos	Semente com 3 mm de comprimento em uma vagem, localizada em um dos quatro últimos nós da haste principal, com a folha completamente desenvolvida
R ₆	Pleno enchimento de grãos	Vagem contendo semente verde que preencha a sua cavidade, localizada em um dos quatro últimos nós da haste principal, com a folha completamente desenvolvida
R ₇	Maturação fisiológica	Uma vagem normal sobre a haste principal que tenha atingido a cor da vagem madura
R ₈	Maturação de colheita	95% das vagens atingindo a cor de vagem madura

Fonte: Alvares Filho (1988)

As avaliações efetuadas estão descritas na Tabela 4. O experimento iniciou no ano de 2000 sobre campo nativo.

TABELA 4. Cronograma das atividades relevantes, amostragens e avaliações realizadas no experimento de campo, no período 2000-2003

Estádios de desenvolvimento	Datas	Avaliações
Semeadura	20/12/2000	-
Vegetativo: V2	22/01/2001	N mineral do solo
Florescimento: V5	07/02/2001	N mineral do solo Nº e peso de nódulos MS da parte aérea da soja N total do tecido parte aérea
Enchimento de grãos: R2	21/03/2001	N mineral do solo Nº e peso de nódulos MS da parte aérea da soja N total do tecido parte aérea
Maturação fisiológica: R8	14/05/2001	Rendimento de grãos N total do grão
Antes da semeadura	25/11/2002	Amostragem de solo - experimento em casa de vegetação
Semeadura	23/12/2002	-
Vegetativo: V2	17/01/2003	N mineral do solo
Florescimento: V5	27/02/2003	N mineral do solo Nº e peso de nódulos Soroaglutinação dos nódulos MS da parte aérea da soja N total do tecido parte aérea
Enchimento de grãos: R2	28/03/2003	N mineral do solo Nº e peso de nódulos MS da parte aérea da soja N total do tecido parte aérea
Maturação fisiológica: R8	09/05/2003	N mineral do solo Rendimento de grãos N total do grão

3.4.1 Nodulação

A avaliação da nodulação da soja foi realizada nos diferentes tratamentos do experimento de campo. Foram amostradas aleatoriamente 10 plantas por tratamento. As avaliações foram (i) peso da matéria seca da parte aérea; (ii) número de nódulos; (iii) peso de nódulos de plantas de soja. Estádios de avaliações: no período vegetativo, quando os nódulos estavam no início de sua atividade e no pleno florescimento, período de máxima fixação biológica do nitrogênio (FBN). As plantas foram separadas em parte aérea, raiz e nódulos.

Para a determinação da massa, o material foi seco a 65°C até atingir massa constante. O nitrogênio total na parte aérea foi avaliado segundo Tedesco et al. (1995).

3.4.2 Nitrogênio mineral do solo

Foram efetuadas amostragens do solo na camada de 0 a 20cm, com o objetivo de monitorar a concentração de nitrogênio mineral. O teor de nitrogênio mineral foi determinado nos estádios V2, V5 e R2, no ano agrícola 2000/2001, e no ano agrícola de 2002/2003, nos estádios V2, V5, R2 e R8 (Tabela 3).

Foram coletados ao acaso 12 subamostras de solo em cada tratamento para formar uma amostra composta. Após homogeneização da amostra, transferiram-se 50g de solo para um frasco com capacidade para 300mL contendo 200mL de solução KCl (2M). Outra porção foi armazenada em lata vedada para determinação posterior da umidade. O método utilizado para determinação do nitrogênio mineral do solo foi o descrito em Tedesco et al. (1995).

3.4.3 Produção de grãos e fertilidade do solo

Cada tratamento apresentava cinco linhas de soja espaçadas de 0,45m. Foi utilizada uma área de 45m², constituída de três subamostras de 15m², escolhidas aleatoriamente dentro das três linhas centrais de cada parcela, para avaliação da produção de grãos, expressa a 13% de umidade. Antes e após os cultivos, foi efetuada amostragem do solo para avaliação da fertilidade do solo através da concentração de macro e micronutrientes, conforme procedimento descrito por Tedesco et al. (1995).

3.5 Determinação da sobrevivência, no solo, das estirpes inoculadas

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, cultivando-se soja em vasos "Leonard". A temperatura na casa de vegetação variou entre 28 - 35°C durante o período de crescimento.

O plantio foi realizado em vasos Leonard modificados esterilizados contendo areia e vermiculita (1/2, v/v) e solução nutritiva de Norris (Vincent,

1970) isenta de nitrogênio. O pH foi ajustado a 6,8, segundo Andrade & Hamakawa (1994). A disposição dos vasos foi aleatória com três repetições e testemunha sem inóculo.

Utilizou-se, como inóculo, 10mL de suspensão de solo do experimento de campo. A suspensão foi feita com 10g de solo em 90mL de solução salina (0,85% de NaCl). As amostras de solo foram coletadas antes da semeadura da cultura da soja de 2002, o que determina um período de dois anos após a primeira inoculação (cultura da soja de 2000). A amostragem foi realizada na camada de 0 a 20cm de profundidade. Os tratamentos amostrados foram as parcelas com adubação mineral e as parcelas com adubação orgânica, totalizando 12 tratamentos (Figura 1).

As sementes de soja da variedade BRS-156 foram previamente desinfestadas através da imersão em álcool (70%) durante três minutos e, após, em solução de hipoclorito de sódio comercial (0,4%), durante dois minutos, sendo em seguida lavadas repetidas vezes com água destilada esterilizada. Inicialmente, foi feita a pré-germinação e, após três dias, procedeu-se o transplante, colocando-se quatro plântulas por vaso. Aos sete dias após o transplante, realizou-se o desbaste e a inoculação, deixando-se duas plântulas por vaso.

As plantas foram coletadas 35 dias após o plantio, próximo ao florescimento. Os nódulos foram lavados, separados por tratamentos e armazenados em frascos contendo sílica-gel. Os nódulos obtidos foram tipificados por soroaglutinação conforme item 3.6.

3.6 Tipificação das estirpes presentes em nódulos de soja após a segunda inoculação

Os tratamentos escolhidos para esta avaliação foram: PD, PR e PC, sob adubação orgânica e adubação mineral e com e sem inoculação, totalizando 12 tratamentos. Foram coletadas 10 plantas por tratamento. Destas, selecionaram-se 40 nódulos aleatoriamente. Os nódulos foram transferidos para tubos contendo sílica-gel, onde permaneceram armazenados.

Inicialmente, cada nódulo seco foi transferido para um tubo de ensaio contendo solução salina esterilizada (0,85% de NaCl) para reidratação. Após, eles foram desinfestados superficialmente pela imersão em álcool (70%)

durante um minuto e meio e, após, solução de hipoclorito de sódio (0,4%) durante um minuto, sendo em seguida lavado cinco vezes com solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). Em seguida foram macerados, em tubos de ensaio, com 1 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), utilizando um bastão de vidro esterilizado. Esta suspensão foi incubada (banho de água) a 100°C durante 1 hora para inativação dos antígenos flagelares. Após a incubação, foi acrescentado 160 µL do corante cristal violeta (0,05% em etanol) a cada 2 mL da suspensão nodular.

As suspensões dos bacteróides foram caracterizadas sorologicamente pela técnica de soroaglutinação, segundo Nishi (1995), para identificação das estirpes formadoras dos nódulos.

As estirpes empregadas na produção de antisoros, utilizadas como antígeno na reação de aglutinação, foram multiplicadas em meio TY, centrifugadas (10000rpm, 30min a 4°C) e ressuspendidas em solução salina (0,85% de NaCl), padronizadas pela densidade ótica de 200 unidades Klett. A esta suspensão foi adicionado 0,03% de formaldeído e 0,05% de violeta cristal.

Os anti-soros das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do MIRCEN – FEPAGRO, sendo utilizados os títulos superiores a 1:800. Realizou-se o teste de reação cruzada para determinar a qualidade deste soro, não tendo sido observada reação positiva para outras estirpes.

A reação de aglutinação foi feita em placas de Takatsi, com fundo em “V” ou em “U”. Em cada poço foram adicionados 50 µL de suspensão nodular e 50 µL do anti-soro diluído a 1:25 em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). As placas foram agitadas por cinco minutos em agitador orbital, e em seguida deixadas em repouso à temperatura ambiente por 24 horas para a manifestação da reação. Quando ocorria uma reação de aglutinação, o resultado era positivo para a presença da estirpe testada.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico SANEST, e submetidos à análise de variância com teste F, utilizando o Teste de DMS. A diferença entre médias foi avaliada pelo valor de probabilidade do erro (valor do nível de significância, o qual deve ser aceito para que as médias

avaliadas sejam consideradas diferentes). O modelo estatístico utilizado para todas as variáveis, exceto N mineral do solo é demonstrado na *Equação 1*. O modelo estatístico utilizado para avaliar as diferenças observadas na variável nitrogênio mineral do solo (*Equação 2*) é diferente, pois não foi considerado o efeito de inoculação.

$$Y_{ixy} = \mu_i + P_x + I_y + BP_{ix} + BI_{iy} + PI_{xy} + BPI_{ixy} + \varepsilon \quad (1)$$

$$Y_{ix} = \mu_i + B_i + P_x + BP_{ix} + \varepsilon \quad (2)$$

onde:

μ = média ; B = sistemas (i = 1,2,3); P = preparos (x = 1,2,3);

I = inoculação (y = 1,2); ε = erro experimental

Y_{ixy} = valor observado no bloco i, do preparo x e inoculação y

Y_{ix} = valor observado no bloco i do preparo x

Análises de regressão também foram efetuadas para os dados relativos ao teor de N mineral do solo, a massa seca de nódulos e a produção de grãos:

$$Y = a + b_1X_{i1} + b_2X_{i2} + \dots + b_pX_{ip} + \varepsilon_i \quad (3)$$

onde:

a, b1, b2, ... bp seriam os parâmetros da relação linear procurada;

X_k (k=1..p) seria uma variável com as leituras de uma certa grandeza Y

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resposta à inoculação

A resposta à inoculação da soja pôde ser avaliada pelo número e massa dos nódulos (Tabela 5 e 6), massa e nitrogênio total do tecido da parte aérea (Tabela 7 e 8) e pela produção e teor de nitrogênio nos grãos (Tabela 9). Os resultados obtidos correspondem ao primeiro (2000/2001) e segundo cultivo de soja (2002/2003) do experimento de campo. Os resultados do segundo cultivo de soja ainda permitem avaliar o efeito da reinoculação.

4.1.1 Número e massa de nódulos

O número e massa dos nódulos secos, avaliados nos estádios V5 e R2 dos anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003, podem ser observados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os dados mostram que, nas condições deste experimento, o aumento no número de nódulos determinou um aumento na massa de nódulos ($r > 0,9$). Esta relação ocorreu porque os nódulos avaliados apresentavam tamanhos semelhantes.

A inoculação determinou aumento no número e massa de nódulos. Houve maior resposta à inoculação no plantio direto e na adubação mineral com irrigação. Observou-se ainda um estabelecimento precoce da nodulação da soja nas parcelas irrigadas. Provavelmente, o efeito do estabelecimento precoce dos nódulos da soja, nas parcelas irrigadas, deve-se ao fato da eliminação de alguns fatores que afetam a nodulação, como déficit hídrico do solo e temperatura elevada, pois foram observados períodos de déficit hídrico (Apêndice 3) durante a semeadura da soja nos dois cultivos. Observações semelhantes foram feitas por Bowen & Kennedy (1959), Hardarson & Jones (1979), Montañes et al. (1995).

No primeiro cultivo (Tabela 5) de soja houve maior resposta à inoculação, quando comparado ao segundo cultivo (Tabela 6), em termos de aumento do número e da massa de nódulos. A falta de nódulos nas plantas de soja, nas parcelas não inoculadas (Tabela 5), durante o primeiro cultivo, e o fato da área experimental não ter sido cultivada anteriormente, indicam que não havia população de *Bradyrhizobium* estabelecida antes do primeiro cultivo. Thies et al. (1991a, b) reporta que a resposta à inoculação foi altamente dependente do número de rizóbios já estabelecidos no solo.

TABELA 5. Número e massa seca de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no florescimento pleno (R2) da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2000/2001

Tratamento		Número ¹		Massa seca	
		V5 ²	R2 ³	V5	R2
		----- n° planta ⁻¹ -----		----- mg planta ⁻¹ -----	
Adubação Mineral + Irrigado					
Inoculado	PD	20	33	321	487
	PR	8	45	120	289
	PC	6	28	59	256
Não Inoculado	PD	3	7	77	99
	PR	1	1	8	7
	PC	1	7	7	23
Adubação Mineral					
Inoculado	PD	3	47	31	345
	PR	3	30	12	199
	PC	3	23	10	158
Não Inoculado	PD	0	2	0	21
	PR	0	0	0	0
	PC	0	0	0	2
Adubação Orgânica					
Inoculado	PD	7	49	91	338
	PR	9	39	52	316
	PC	5	32	22	314
Não Inoculado	PD	0	7	0	107
	PR	0	2	2	7
	PC	0	5	0	99
Valor P – Teste DMS					
Adubação		0,00001	0,00249	0,00120	0,10759
Preparo		0,00008	0,18733	0,00859	0,03377
Inoculação		0,00001	0,00001	0,00090	0,00001
CV (%)		11,9	12,5	27,2	29,8

¹ Dados transformados por $\sqrt{x+1}$; ² Estádio do quinto nó; ³ Estádio do pleno florescimento

Entretanto, no segundo cultivo, as parcelas não inoculadas já apresentavam estirpes de *Bradyrhizobium*, conforme o resultado dos sorogrupos de bradirrizóbios presentes no solo após dois anos da primeira inoculação (Tabela 10). Isto explicaria o aumento da ocorrência de nódulos nas plantas de soja, nas parcelas não inoculadas, durante o segundo cultivo (Tabela 6). Salienta-se que, apesar disso, as plantas das parcelas inoculadas apresentaram maior número e massa de nódulos nos dois cultivos.

TABELA 6. Número e massa seca de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no florescimento pleno (R2) da soja submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2002/2003

Tratamento	Número ¹		Massa seca		
	V5 ²	R2 ³	V5	R2	
	----- nº planta ⁻¹ -----		---- mg planta ⁻¹ ----		
Adubação Mineral + Irrigado					
Inoculado	PD	14	20	139	210
	PR	4	18	62	187
	PC	4	11	42	167
Não Inoculado	PD	7	19	69	168
	PR	7	17	54	140
	PC	2	5	33	74
Adubação Mineral					
Inoculado	PD	11	20	122	199
	PR	4	12	48	163
	PC	4	5	37	108
Não Inoculado	PD	5	14	49	114
	PR	5	10	38	64
	PC	2	7	26	83
Adubação Orgânica					
Inoculado	PD	4	7	41	60
	PR	5	3	38	52
	PC	3	5	40	37
Não Inoculado	PD	4	4	30	29
	PR	3	2	35	72
	PC	3	3	28	56
Valor P – Teste DMS					
Adubação	0,00084	0,00001	0,00680	0,00001	
Preparo	0,00001	0,00003	0,00062	0,01345	
Inoculação	0,01555	0,03166	0,00425	0,00096	
CV (%)	16,1	13,7	21,8	29,3	

¹ Dados transformados por $\sqrt{x+1}$; ² Estádio do quinto nó; ³ Estádio do pleno florescimento

A presença de população de *Bradyrhizobium* nas parcelas não inoculadas, durante o segundo cultivo deve-se, provavelmente, à contaminação

e colonização das estirpes utilizadas nas parcelas inoculadas durante o primeiro cultivo, já que as parcelas inoculadas e não inoculadas ficavam lado a lado, sem qualquer barreira que as separassem.

A observação do número e massa de nódulos (Tabelas 5 e 6) das plantas de soja em dois estádios (V5 e R2) permitiu avaliar quais os tratamentos que condicionaram a nodulação precoce, merecendo destaque o plantio direto e adubação mineral com irrigação. Efeito semelhante foi observado por outros pesquisadores (Voss & Sidiras, 1985; Hungria & Stacey, 1997; Hungria et al., 1997).

4.1.2 Matéria seca e o nitrogênio total do tecido da parte aérea das plantas

Os resultados de massa seca e nitrogênio total (N total) do tecido da parte aérea das plantas nos estádios V5 e R2, dos anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003 são mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Os resultados das Tabelas 7 e 8 indicam que houve aumento da massa seca e do nitrogênio total do tecido da parte aérea das plantas pertencentes às parcelas inoculadas.

No primeiro cultivo (2000/2001), a adubação orgânica teve efeito positivo sobre a massa seca e N total do tecido da parte aérea da soja. O aumento de massa observado no ano agrícola 2000/2001 no tratamento adubação orgânica pode estar associado com a maior disponibilidade de fósforo da cama de aviário. Análises químicas do solo (Apêndice 1) realizadas após a colheita do primeiro cultivo, demonstram maior teor de fósforo (P) nas parcelas adubadas com cama de aviário. Os teores de nutrientes e características químicas da cama de aviário são apresentados no Apêndice 2.

No segundo cultivo (2002/2003), as parcelas com adubação mineral irrigadas foram responsáveis pelo maior efeito no aumento de massa e N total do tecido da parte aérea da soja. Os sistemas de preparo também influenciaram nestes atributos. Houve aumento de massa e N total do tecido nos preparos PD e PR quando comparados ao PC.

TABELA 7. Massa seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas no estádio do quinto nó (V5) e no florescimento pleno (R2) submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2000/2001

Tratamento	Massa seca		N Total no tecido		
	V5 ¹	R2 ²	V5	R2	
	----- g planta ⁻¹ -----		---- mg ----		
Adubação Mineral + Irrigado					
Inoculado	PD	3,7	15,3	166	443
	PR	6,1	18,5	269	253
	PC	5,3	9,3	200	271
Não Inoculado	PD	3,8	11,9	169	592
	PR	5,4	9,8	215	321
	PC	5,7	13,4	219	399
Adubação Mineral					
Inoculado	PD	3,3	7,1	139	153
	PR	3,8	11,1	168	278
	PC	3,5	9,0	151	257
Não Inoculado	PD	3,0	6,3	131	221
	PR	3,1	9,1	118	155
	PC	2,9	8,1	112	222
Adubação Orgânica					
Inoculado	PD	5,3	14,5	241	476
	PR	6,9	17,7	337	646
	PC	10,0	18,4	492	570
Não Inoculado	PD	4,6	17,2	203	622
	PR	5,9	15,3	213	585
	PC	8,4	19,7	385	687
Valor P – Teste DMS					
Adubação	0,00029	0,00331	0,00001	0,00011	
Preparo	0,02654	0,60271	0,00222	0,79256	
Inoculação	0,64885	0,66196	0,01505	0,64367	
CV (%)	33,4	22,4	23,3	32,7	

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do pleno florescimento

Provavelmente, no segundo cultivo as parcelas irrigadas possibilitaram maior massa e N total do tecido da parte aérea, comparado às parcelas não irrigadas, devido à ocorrência de períodos de déficit hídrico (Anexo 3). É sabido que deficiências hídricas no período vegetativo provocam redução da taxa de crescimento, da atividade fotossintética, da fixação de N e do metabolismo da planta (Baioni et al., 1989; Marcos Filho, 1986).

TABELA 8. Massa seca e teor de nitrogênio da parte aérea das plantas no estádio do quinto nó (V5) e no florescimento pleno (R2) submetida a diferentes manejos do solo e inoculação. Média de duas repetições. Ano agrícola de 2002/2003

Tratamento	Massa seca		N Total no tecido		
	V5 ¹	R2 ²	V5	R2	
	----- g planta ⁻¹ -----		---- mg ----		
Adubação Mineral + Irrigado					
Inoculado	PD	3,4	20,1	120	655
	PR	6,4	23,5	197	658
	PC	1,4	7,1	41	243
Não Inoculado	PD	2,4	13,5	81	431
	PR	3,0	12,0	88	318
	PC	2,6	10,2	79	322
Adubação Mineral					
Inoculado	PD	1,9	11,7	67	445
	PR	1,5	7,9	43	256
	PC	0,2	1,3	6	45
Não Inoculado	PD	1,7	8,9	56	338
	PR	1,0	8,0	31	245
	PC	0,3	2,4	8	80
Adubação Orgânica					
Inoculado	PD	0,2	0,9	7	23
	PR	0,6	1,9	28	54
	PC	1,8	5,0	48	110
Não Inoculado	PD	0,2	0,7	4	19
	PR	1,3	4,4	37	104
	PC	0,8	3,6	23	81
Valor P – Teste DMS					
Adubação	0,00005	0,00001	0,00005	0,00001	
Preparo	0,03163	0,00989	0,02939	0,00309	
Inoculação	0,16539	0,17705	0,11830	0,10689	
CV (%)	28,0	23,6	31,2	29,7	

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do pleno florescimento

4.1.3 Produção de grãos e teor de nitrogênio nos grãos

Os resultados de produção e teor de nitrogênio nos grãos dos anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003 são apresentados na Tabela 9. Os dois blocos que receberam adubação orgânica não foram colhidos no segundo período devido à competição com plantas invasoras. Estas parcelas receberam um manejo diferenciado, sem utilização de agroquímicos.

Houve resposta à inoculação no primeiro cultivo, com aumento médio de 200 kg ha⁻¹ na produção de grãos. No segundo cultivo, não houve resposta à inoculação, considerando-se todos os tratamentos. Entretanto,

pode-se observar aumento no rendimento de grãos de 125 kg ha⁻¹ na parcela com adubação mineral e irrigação.

TABELA 9. Produção de grãos e teor de nitrogênio nos grãos de soja. Média de duas repetições. Anos agrícolas de 2000/2001 e 2002/2003

Tratamento	2000/2001		2002/2003		
	Produção	Teor de N	Produção	Teor de N	
	kg ha ⁻¹	g kg ⁻¹	kg ha ⁻¹	g kg ⁻¹	
Adubação Mineral + Irrigado					
Inoculado	PD	2.858	57,4	3.300	58,1
	PR	2.652	56,9	2.975	56,9
	PC	2.601	55,7	2.175	56,4
Não Inoculado	PD	2.660	57,5	3.100	57,7
	PR	2.107	66,6	2.875	57,0
	PC	2.725	56,0	2.100	55,9
Adubação Mineral					
Inoculado	PD	1.766	56,1	2.975	57,1
	PR	2.441	55,8	1.750	56,5
	PC	2.159	56,0	1.375	56,2
Não Inoculado	PD	1.463	66,3	3.275	57,6
	PR	2.180	55,8	1.850	56,4
	PC	2.238	56,1	1.300	56,0
Adubação Orgânica					
Inoculado	PD	1.141	48,9		
	PR	1.305	53,7		
	PC	1.492	51,7		
Não Inoculado	PD	893	52,2		
	PR	1.231	47,8		
	PC	1.148	52,0		
Valor P – Teste DMS					
Adubação	0,00001	0,00001	0,01319	0,13040	
Preparo	0,25668	0,89341	0,01240	0,02616	
Inoculação	0,14250	0,68876	0,73972	0,66728	
CV (%)	20,1	2,8	28,1	1,0	

O benefício da inoculação, na produção de grãos, pode ser medido pelo aumento do rendimento de grãos e pelo retorno econômico que esta prática possibilita. Para se ter idéia do benefício econômico da FBN, considerando-se o uso de 70kg de sementes ha⁻¹ para instalação de lavoura de soja, seriam necessários 800g de inoculante turfoso esterilizado (400g de inoculante por 40kg de sementes). Atualmente (março/2004), um pacote de inoculante, veiculado em turfa esterilizada (200g de turfa) custa em torno de R\$4,00 ao produtor. Portanto para inocular 70kg de sementes gastar-se-ia

R\$16,00. Produtividades na ordem de 3000kg ha⁻¹ exportam cerca de 180kg de N. Para repor esta exportação, seria necessário aplicar-se 360kg de N ha⁻¹, considerando-se as perdas médias de 50% dos adubos nitrogenados. Como o preço médio do kg de N é de R\$ 1,80, a economia com o uso do inoculante, comparado ao uso do fertilizante mineral nitrogenado, seria de R\$632,00 ha⁻¹ (360kg x R\$1,80kg⁻¹ = R\$ 648,00 ha⁻¹ - R\$ 16,00 = R\$ 632,00 ha⁻¹).

Os tratamentos sob adubação mineral com irrigação foram os que apresentaram maior produtividade (Tabela 9). No segundo cultivo a produção foi fortemente influenciada pelos efeitos da forma de adubação e preparo do solo. Sendo que o tratamento que apresentou maior produção de grãos, foi o PD com adubação mineral e irrigado. Segundo Garcia-Blásquez et al. (1991) as maiores respostas à inoculação obtidas em condições de irrigação demonstram que as limitações de água à planta são restritivas à fixação do N.

4.2 Nitrogênio mineral do solo

O teor de nitrogênio mineral do solo, nos diferentes tratamentos, referentes aos dois cultivos e comparados ao campo nativo, pode ser observado na Figura 2.

Observa-se que o teor de nitrogênio mineral do solo é mais alto na primeira avaliação e vai reduzindo durante o ciclo da cultura, aproximando-se dos valores observados no campo nativo. Os preparos do solo com maior mobilização (PC e PR) apresentaram maior quantidade de nitrogênio quando comparados ao PD. O teor de nitrogênio é maior nos estádios iniciais da cultura provavelmente, pela maior mineralização da matéria orgânica após o preparo do solo e a semeadura. A mineralização é maior à medida que aumenta a mobilização do solo. Quando o solo é pouco mobilizado, reduzem-se as taxas de mineralização e nitrificação e aumenta-se a imobilização do nitrogênio e o potencial de desnitrificação, causando um decréscimo do nitrogênio mineral do solo (Doran, 1980).

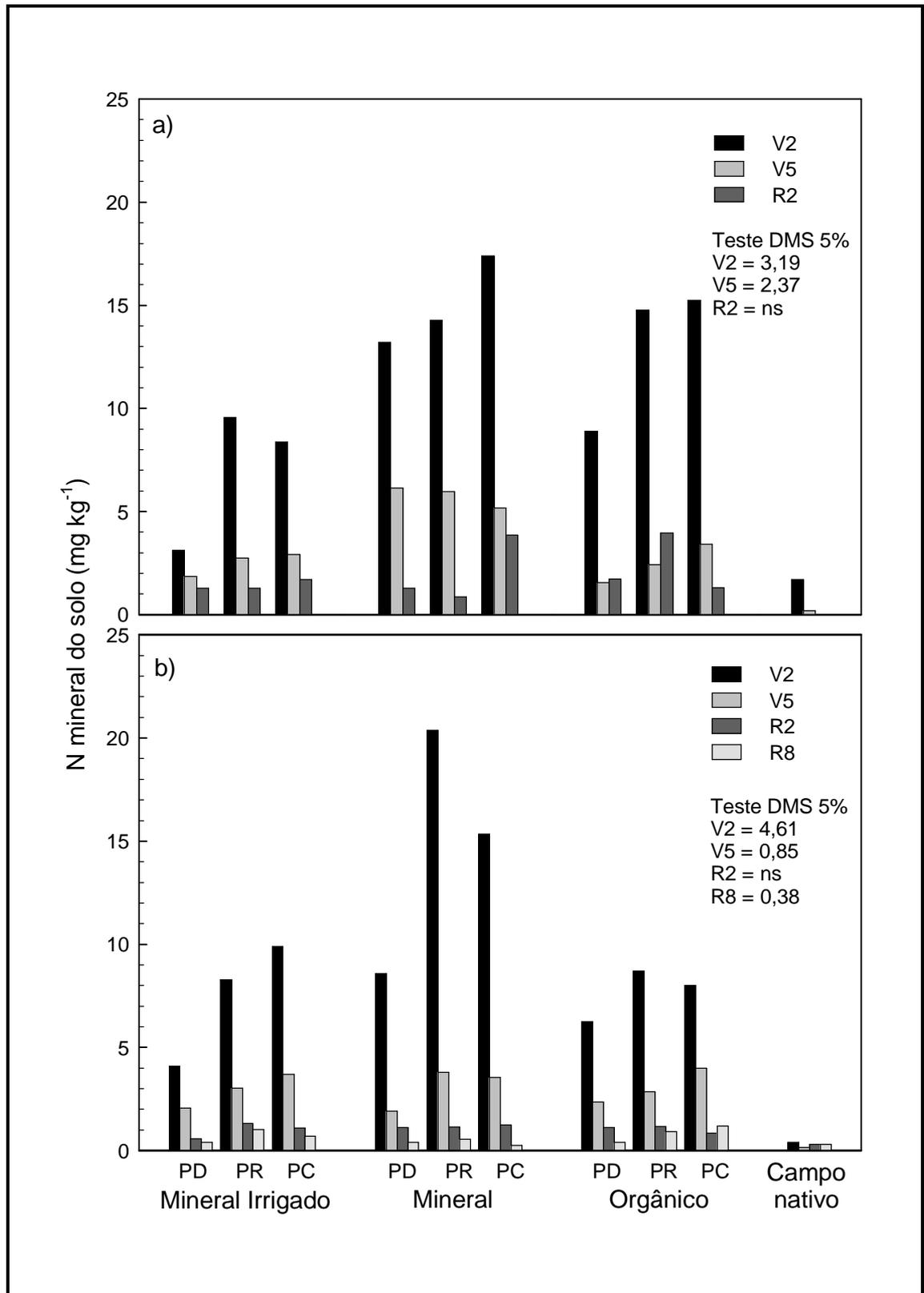


FIGURA 2. Teor de nitrogênio mineral do solo sob cultivo de soja, avaliados nos estádios: V2, V5 e R2 referentes ao ano agrícola de 2000/2001 (a); e V2, V5, R2 e R8 referentes ao ano agrícola 2002/2003 (b).

4.3 Efeito do teor de nitrogênio mineral do solo na nodulação e rendimento da soja

Os dados de massa seca de nódulos e produção de grãos utilizados na confecção dos gráficos, apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, foram obtidos nas parcelas inoculadas. Excluíram-se os dados do bloco com adubação orgânica nos gráficos das Figuras 4 e 5 devido à presença de plantas invasoras. Utilizaram-se os dados de massa seca de nódulos avaliados no estágio V5 (Figuras 3 e 4). Os dados de N mineral utilizados na confecção dos gráficos das Figuras 3, 4 e 5 foram determinados no estágio inicial da cultura (V2).

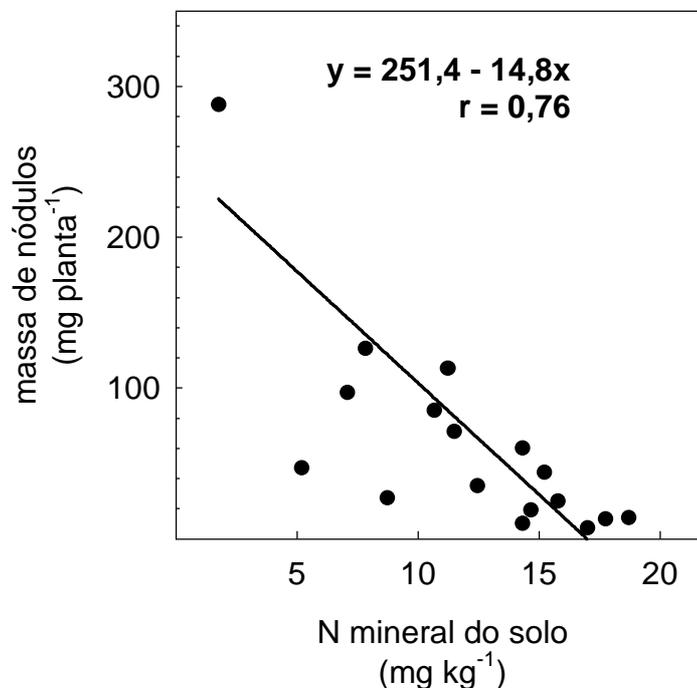


FIGURA 3. Efeito do N mineral do solo sobre a massa seca de nódulos. Dados das parcelas inoculadas. Nodulação avaliada no estágio V5 e nitrogênio mineral no V2. Dados do ano agrícola de 2000/2001.

Observa-se uma relação negativa entre o teor de N mineral do solo e massa seca de nódulos (Figuras 3 e 4). Os gráficos das Figuras 3 e 4 apresentam coeficientes de correlação de 0,76 e 0,69, demonstrando uma estreita relação desses atributos. Nos tratamentos onde os teores de nitrogênio mineral foram mais elevados ($\text{N mineral} > 12 \text{ mg kg}^{-1}$), a massa e o número de nódulos foram menores do que àqueles observados onde os teores foram mais baixos. Trabalhos desenvolvidos na década de 70 e 80 já apontavam para os

efeitos negativos do nitrogênio mineral do solo sobre a nodulação (Freire et al. 1975; Selbach, 1978; Streeter, 1988). Estes resultados mostram que a nodulação é reduzida na presença de teores elevados de nitrogênio no solo.

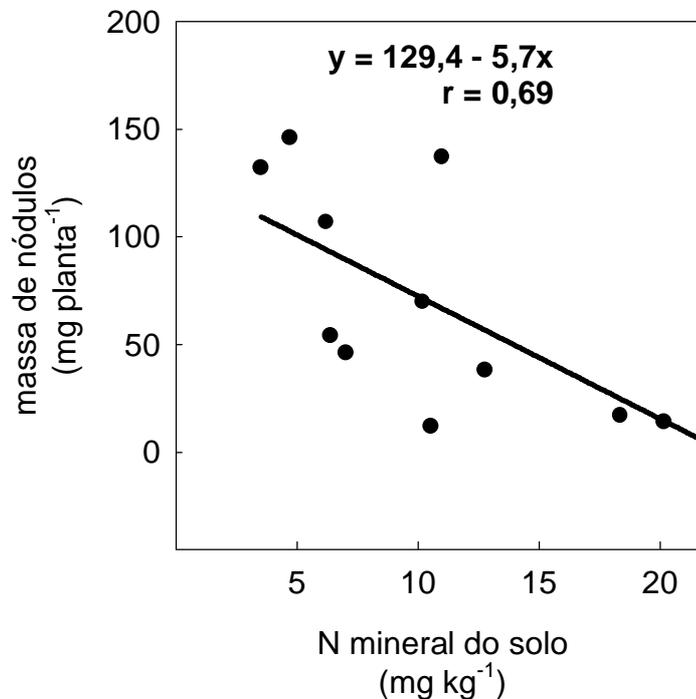


FIGURA 4. Efeito do N mineral do solo sobre a massa seca de nódulos. Dados das parcelas inoculadas. Nodulação avaliada no estágio V5 e nitrogênio mineral no V2. Dados dos blocos de adubação mineral com e sem irrigação do ano agrícola de 2002/2003.

Na Figura 5 observa-se a relação entre o teor de N mineral do solo e a produção de grãos. Utilizou-se dados de três avaliações do teor de N mineral do solo (V2, V5 e R2) e a produção de grãos obtidos nos dois cultivos. Os gráficos mostram uma correlação negativa entre o teor de N mineral do solo e a produção de grãos em todas as avaliações. Os valores de coeficiente de correlação entre os teores de N mineral do solo obtidos no estágio inicial da cultura da soja (V2), e a produção de grãos nos anos agrícolas de 2000/2001 (a) e 2002/2003 (b) são maiores. A relação entre estes atributos diminui com o passar do tempo.

Possivelmente, os teores de N mineral do solo, determinados neste experimento, afetaram indiretamente a produção de grãos na soja inoculada. A mobilização do solo e conseqüente favorecimento dos fatores que afetam a mineralização da matéria orgânica (aeração, contato, umidade), determinaram

aumento dos teores de N mineral no início do desenvolvimento da soja prejudicando a nodulação. Com o desenvolvimento das plantas, a demanda por nitrogênio aumentou. Entretanto, a capacidade do solo em suprir nitrogênio mineral diminuiu e a nodulação, prejudicada na sua fase inicial, não foi suficiente para compensar esta demanda pela FBN, mesmo com aparecimento de nodulação tardia.

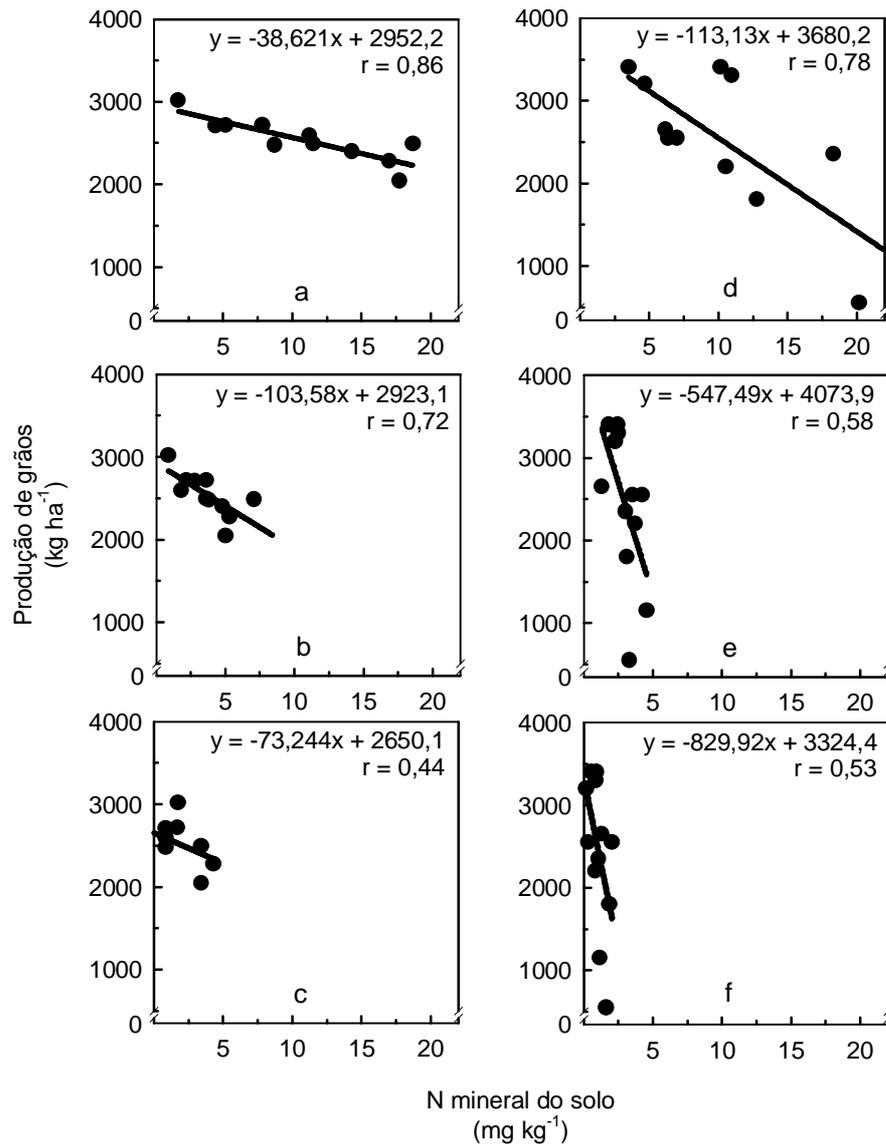


FIGURA 5. Correlação entre produção de grãos e N mineral do solo sob cultivo de soja. Os dados de N mineral do solo referem-se aos seguintes estádios fenológicos da cultura da soja: (a,d) V2, (b,e) V5 e (c,f) R2. Os dados de produção de grãos referem-se aos seguintes anos agrícolas: (a,b,c) 2000/2001 e (d,e,f) 2002/2003.

As correlações obtidas no presente trabalho, mostram que o teor de nitrogênio mineral do solo afetou tanto a nodulação (Figuras 3 e 4) quanto a produção de grãos (Figura 5) e sua influência é maior nos estádios iniciais da cultura. Constatou-se que a prática da inoculação de sementes de soja acarreta em aumento de número e massa de nódulos (Tabelas 5 e 6), que por sua vez acarreta em aumento da produção de grãos. Ainda é possível afirmar que o sucesso da inoculação depende de práticas de manejo e/ou preparo do solo que reduzam o teor de nitrogênio do solo, como o PD e PR, aumentando a demanda de nitrogênio e estimulando a nodulação e a FBN.

4.4 Sobrevivência e migração, no solo, das estirpes inoculadas

O resultado da avaliação da ocupação nodular, determinada em 40 nódulos por tratamento, selecionados aleatoriamente é apresentado na Tabela 10. Observa-se que todas estirpes sobreviveram no solo após dois anos da primeira inoculação. Entretanto, as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram melhor habilidade competitiva e de colonização do solo, mostrada pela maior ocorrência nos nódulos.

TABELA 10. Ocupação nodular da cultivar de soja BRS-156 desenvolvida em vaso Leonard esterilizado. Inoculado com suspensão de solo amostrado nos tratamentos do experimento de campo, após dois anos da primeira inoculação (2000/2001). Valores referentes a 40 nódulos avaliados por tratamento. Média de duas repetições.

Tratamento	Estirpes				Ocupação Múltipla	Não reagiram	CV (%)	
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080				
Adubação Mineral								
Inoculado	PD	24 a	18 b	2 d	8 c	18	6	13,3
	PR	24 a	12 b	0 d	6 c	6	4	20,2
	PC	14 a	10 ab	10 ab	6 b	4	4	17,9
Não Inoculado	PD	32 a	24 b	1 c	0 c	21	5	15,1
	PR	34 a	18 b	4 c	2 c	18	0	21,0
	PC	27 a	20 b	2 c	0 c	13	4	16,3
Adubação Orgânica								
Inoculado	PD	20 b	30 a	8 c	6 c	20	0	17,1
	PR	24 a	14 b	8 b	8 b	14	1	13,7
	PC	16 b	26 a	6 c	8 c	16	0	16,7
Não Inoculado	PD	27 a	32 a	2 b	2 b	25	2	13,5
	PR	30 a	30 a	2 b	3 b	27	2	10,0
	PC	24 a	25 a	3 b	4 b	16	0	15,1

Valores seguidos pela mesma letra, dentro da mesma linha, não diferem estatisticamente (teste de DMS, $p = 0,05$)

A maior competitividade das SEMIA 587 e SEMIA 5019 é demonstrada pela maior ocorrência nos nódulos avaliados e a habilidade em colonizar o solo fica evidenciada pela maior ocorrência destas estirpes nos tratamentos não inoculados quando comparados ao inoculado.

Observa-se um índice relativamente elevado de ocupação múltipla dos nódulos avaliados, com predominância dos sorogrupos das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 praticamente só ocorrem nas parcelas inoculadas, indicando uma baixa sobrevivência no solo. Em solos com população naturalizada de Rizóbio, as estirpes que predominam são as três mais competitivas: SEMIA 5019 (29w), SEMIA 566 e SEMIA 587 (Hungria et al.1994; Vargas & Hungria, 1997). Sendo, inclusive, estas estirpes indicadas para estudos de competitividade com a cultura da soja (Hungria et al., 1994).

4.5 Tipificação das estirpes inoculadas presentes em nódulos de soja após a segunda inoculação

O resultado da ocupação nodular, avaliada por soroaglutinação, das estirpes utilizadas no experimento de campo é apresentado na Tabela 11. Os nódulos utilizados foram coletados das plantas de soja durante o segundo cultivo (2002/2003) no estágio fenológico V5. A inoculação resultou na ocorrência de todas estirpes utilizadas. A não ocorrência das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 nas parcelas não inoculadas, indica que estas apresentaram baixa sobrevivência. As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram melhor habilidade competitiva e de colonização do solo. A maior competitividade é demonstrada pela maior ocorrência nos nódulos avaliados. A habilidade de colonizar o solo é demonstrada pela maior ocorrência destas estirpes nos tratamentos não inoculados, quando comparados ao tratamento inoculado. Trabalhos de Frazier & Fred (1922) e Kamicker & Brill (1987) indicam que o movimento do rizóbio no solo é limitado, e que essa falta de movimento pode limitar a ocupação nodular.

Os dados demonstram que a inoculação é uma prática necessária para aumentar a nodulação. Também permite que estirpes menos competitivas e/ou com menor sobrevivência consigam ocorrer nos nódulos das raízes de soja.

Tabela 11. Ocupação nodular da cultivar de soja BRS-156 avaliada em diferentes tratamentos do experimento de campo. Referente ao segundo cultivo (2002/2003). Valores referentes a 40 nódulos avaliados por tratamento. Média de 2 repetições

Tratamento	Estirpes				Ocupação Múltipla	Não reagiram	CV (%)	
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080				
Adubação Mineral								
Inocu- lado	PD	27 a	22 b	5 c	5 c	19	0	11,7
	PR	25 a	22 a	6 b	3 b	16	0	18,9
	PC	20 a	19 a	7 b	3 b	10	1	12,9
Não Inocu- lado	PD	26 a	24 a	0 b	1 b	14	3	12,8
	PR	30 a	23 b	0 c	0 c	18	5	15,2
	PC	33 a	22 b	0 c	0 c	15	0	16,3
Adubação Orgânica								
Inocu- lado	PD	24 a	20 a	6 b	5 b	15	0	21,2
	PR	25 a	14 b	7 c	5 c	12	1	13,6
	PC	20 a	17 a	9 b	7 b	13	0	15,1
Não Inocu- lado	PD	30 a	25 a	0 b	2 b	17	0	16,5
	PR	25 a	16 b	0 c	0 c	5	4	19,5
	PC	27 a	22 a	0 b	0 b	11	2	16,3

Valores seguidos pela mesma letra, dentro da mesma linha, não diferem estatisticamente (teste de DMS, $p = 0,05$)

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos e discutidos na presente pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- A inoculação, nos dois primeiros cultivos, determinou aumento na produção de grãos de soja.
- Estirpes que apresentam baixa sobrevivência no solo dependem da reinoculação para sua ocorrência.
- O teor de nitrogênio mineral do solo prejudicou o processo de fixação biológica do nitrogênio, pois quanto maior o seu teor menor o número e massa de nódulos.
- Os sistemas de manejo e preparo do solo que aumentam a demanda de nitrogênio determinam maior resposta à inoculação. O melhor sistema de manejo e preparo do solo, e que apresentou maior produtividade nos dois cultivos, foi o tratamento inoculado com preparo do solo PD e com adubação mineral e irrigação.
- As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentam maior sobrevivência e competitividade do que as SEMIA 5079 e SEMIA 5080.
- Observa-se migração das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 das áreas inoculadas para as não inoculadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R. et al. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from tree tillage systems. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v.33, p.17-28, 1995.
- ARAÚJO, R.S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R .S. (Eds.) **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.157-170.
- BAIONI,S.S. et al. Efecto de la nodulación en soja bajo deficiencia de água. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DE INVESTIGACIÓN EN SOJA, 4., 1989, Buenos Aires. **Anais...**Buenos Aires: Asociación Argentina de Soja, 1980. p.2022-2028.
- BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 114f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- BHAGWAT, A.A.; KEISTER, D.L. Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.3496-3501, 1991.
- BLEVINS, R.L. et al. Influence of no-tillage and nitrogen fertilization on certain soil properties after 5 years of continuous corn. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, p.383-386, 1977.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Classificação de estirpes de soja utilizadas em estudos e/ou inoculantes brasileiros nas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Eds). **Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSo, 1995. p.332-339.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Relação entre a divisão de *B. japonicum* em genótipos e a eficiência e capacidade competitiva das estirpes In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos...**Londrina: IAPAR, 1994. p.63.

- BOOTE, K.J. et al. Effect of foliar fertilization on photosynthesis, leaf nutrition and yield of soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, p. 787-791, 1978.
- BOWEN, G.D.; KENNEDY, M.M. Effect of high soil temperature on *Rhizobium* spp. Qld. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.16, p. 177-197, 1959.
- BRAGAGNOLO, N. **Efeito da cobertura do solo por resíduos de culturas sobre a temperatura e umidade do solo, germinação e crescimento do milho**. 1986. 119f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.
- BROCKWELL, J. et al. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.143-180, 1995.
- CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D.K.; BAUER, W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.3164-3169, 1988.
- CÂMARA, G.M.S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia de produção**. Piracicaba: [s.n.], 1998. p. 278-293.
- CARROLL, B.J. et al. A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. **Plant Physiology**, Melbourne, v.78, p.34-40, 1985.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendação de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3. Ed. Passo Fundo: SBRS/NRS/EMBRAPA/CNPT, 1995. 224p.
- COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Evangraf, 1996. 233p.
- CHO, M.J.; HARPER, J.E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavanoid concentrations in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiology**, Melbourne, v.95, p. 435-441, 1991.
- DART, P.J.; WILDON, D.C. Nodulation and nitrogen fixation by *Vigna sinensis* and *Vicia autopurpurea*: The influence of concentration, form, and site of application of combined nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.21, p.45-56, 1970.
- DE ANTONI, G.; LOPARDO, H.; GRAU, O. Interference in culture among *Rhizobium* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.409-415, 1981.
- DERPSCH, R. et al. Controle da erosão no Paraná, Brasil: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. **GTZ**, Eschborn, 228p. 1991.

- DIAZ, C.L.; MELCHERS, L.S.; HOOYKAAS, P.J.J. et al. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Nature**, London, v.338, p.579-581, 1989.
- DORAN, J.W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.44, p.764-771, 1980.
- EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil – 1993/1994**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1993. 120p.
- EMBRAPA. **Tecnologias de produção da soja – Região Central do Brasil 2003**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2002. 199p.
- FAO. **Legume inoculation and their use**. Rome, 1984. 63p.
- FRAZIER, W.C.; FRED, E.B. Movement of legume bacteria in soil. **Soil Science**. Madison, v.14, p.29-35, 1922.
- FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.121-140.
- FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J.A. A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.5, p.1-25, 1999.
- FREIRE, J.R.J.; VIDOR, C.; BREMMER, H. Efeito de diferentes níveis de inoculação e da calagem na simbiose de *Rhizobium* e *Glycine max* (L.) Merrill, em oxisol ácido do Planalto Riograndense. In: REUNION LATINOAMERICANA SOBRE *RHIZOBIUM*, 7., 1975, Resistencia. **Anais...** Resistencia: Instituto Agrotécnico. Facultad de Ciencias Agrárias, 1975. p.124-129.
- FREIRE, J.R.J.; VIDOR, C. Fatores limitantes dos solos ácidos na simbiose de *Rhizobium* e as leguminosas. In: DÖBEREINER, J. (Ed.) **As leguminosas na agricultura tropical**. Rio de Janeiro: Ministério de Agricultura, 1971. p.211-247.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morfological, rhizobiotoxine, and hidrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.
- GALLETI, P. et al. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Rio de Janeiro, v.6, p.1-8, 1971.
- GARCIA-BLÁSQUEZ, C. et al. Aumento da fixação de nitrogênio em soja por inoculação, irrigação e cobertura do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.15, p.179-185, 1991.

- GILLER, K.E.; WILSON, K.J. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Wallingford, UK: CAB, 1993. 313p.
- GOMES, P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 152 p.
- GRAHAM, P.H. et al. Acid Ph tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.198-207, 1994.
- GUERIN, V. et al. Proteolysis and nitrogen fixation in faba-bean (*Vicia faba*) nodules under water stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, V.82, p.360-366, 1991.
- GULDEN, R.H.; VESSEY, J.K. The stimulating effect of ammonium on nodulation in *Pisum sativum* L. is not long lived once ammonium supply is discontinued. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.195, p.195-205, 1997.
- GUO, R. et al. Effect of four nitrogen compounds on nodulation and nitrogen fixation in faba bean, white lupin and medic plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.19, p.501-508, 1992.
- HARDARSON, G. et al. Measurements of nitrogen fixation in favabeans at different N fertiliser rates using the ¹⁵N isotope dilution and A-value methods. **Plant Soil**, Dordrecht, v.131, p.161-168, 1991.
- HARDARSON, G.; JONES, D.G. Effect of temperature on competition amongst strains of *Rhizobium trifolii* for nodulation of two white clover varieties. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 92, p. 229-236, 1979.
- HAVELSON, L.J.; STACEY, G. Effect of lectin on nodulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation-defective mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.753-760, 1986.
- HEINRICH, K.; GORDON, D.M.; RYDER, M.H. et al. A rhizopine strain of *Sinorhizobium meliloti* remains at a competitive nodulation advantage after an extended period in the soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1063-1065, 1999.
- HO, S.C.; WANG, J.L.; SHINDLER, M. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II – Isolation and characterization of a galactose specific lectin. **Journal of Cell Biology**, New York, v.111, p.1639-1643, 1990.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.76-170.
- HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E.; ELKAN, G.H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. **Journal of General Microbiology**, New York, v.123, p.215-222, 1981.

- HUBER, T.A.; AGARWAL, A.K.; KEISTER, D.L. Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.158, p.1168-1171, 1984.
- HUDGSON, A.L.M.; ROBERTS, W.P.; WAID, J.S. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin producing strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.475-478, 1985.
- HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.), **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997a. p.189-295.
- HUNGRIA, M. et al. **Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1997b. 9p. (Comunicado Técnico, 56)
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effect of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 149, p. 95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.29, p.819-830, 1997.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Microrganismos de Importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.
- HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, Bronx, v.24, p. 480-421, 1970.
- IBGE. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/lspa>>. Acesso em: 10 fev. 2004.
- IMSANDE, J. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, London, v.37, p.348-355, 1986.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae CONN 1938, 321^{AL}. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willian and Wilkins, 1984. p.235-244.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Methods to alter the recovery and nodule locations of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of field-grown

- soybeans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.1737-1742, 1987.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. **Plant Soil**, Dodrecht, v.112, p.15-22, 1988.
- KEMBER, B.; DERPSCH, R. Results of studies made in and to control erosion by covers crops and no-till tillage techniques in Paraná, Brazil. **Soil and Tillage Research**, New York, v.1, p.253-267, 1981.
- KESSEL, C.V.; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? **Field Crops Research**, London, v.65, p.165-181, 2000.
- KEYSER, H.H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: METTING, F.B. (Ed) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Marcel Decker, 1992. p. 205-226.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium, and phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.43, p.519-523, 1979.
- KUYKENDALL, L.D.; ROY, M.A.; O'NEILL, J.J. et al. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.358-361, 1988.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. Nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. In: ENCONTRO LATINOAMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1993, Ponta Grossa. **Anais...Ponta Grossa: IAPAR**, 1993. p.29-62.
- LEMOS, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões enzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade de hidrogenase**. Jaboticabal: UNESP, 1994. 108 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.
- LIU, R.; TRAN, V.M.; SCHIMIDT, .E.L. Nodulating competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1895-1900, 1989.

- LODEIRO, A.R.; FAVELUKES, G. Early interactions of *Bradyrhizobium* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1405-1411, 1999.
- LOWENDORFF, H.S. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.4, p.87-124, 1981.
- LUNGE, V.R. **Identificação e análise filogenética entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* por RFLP e RAPD.** 1993. 112f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
- MAGALHÃES, C.M. Introdução e evolução da soja no Brasil: no Estado do Rio Grande do Sul. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Eds) **A soja no Brasil.** Campinas: ITAL, 1981. p.18-20.
- MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja.** Campinas: Fundação Cargill, 1986. 86p.
- McDERMOTT, T.R.; GRAHAM, P.H. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.2493-2498, 1989.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, W.; ERDMAN, L.W. Competition between bacterial strains effecting nodulation in soybeans. **Soil Science America Proceedings**, Madison, v.25, p.105-108, 1961.
- MINAMISAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by nifDKE sequence divergence. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.31, p.81-89, 1990.
- MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.30, p.877-884, 1989.
- MINAMISAWA, K.; FUKAI, K. Production in indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.32, p.1-9, 1991.
- MONTAÑES, A. et al. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Applied Soil Ecology** 2, New York, p.165-174, 1995.
- MONTAÑES, A. **Overview and case studies on biological nitrogen fixation:** perspectives and limitations. Disponível em <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/soilbiod/cases/caseb1.pdf>> Acesso em: 22 dez. 2003.

- MOROTE, C.G.B. et al. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.143-150, 1990.
- MUNÉVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Effect of high root temperature and *Rhizobium* strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.45, p.1113-1120, 1981.
- MUNNS, D.N. Soil acidity and related factors. In: VINCENT, J.M. et al. (Eds) **Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture**. Hawaii: University of Hawaii. College Tropical Agriculture, 1977. p. 211-236. (Mis. Publ., 145)
- NISHI, C.Y.M. **Infecção, competitividade e eficiência da fixação biológica do N₂ em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080**. 1995. 115f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.
- NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended in Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, Philadelphia, v.20, p.147-162, 1996.
- NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H.; BRYAN, W.W., (Eds.) **Tropical pasture research: principles and methods**. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crop, 1976. p.134-174.
- PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybean and field bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, p.1-9, 1976.
- PAVAN, M.A. et al. Chemical and mineralogical characteristics of selected acid soils of the State of Paraná, Brazil. **Turrialba**, Londrina, v.35, p.131-139, 1985.
- PERES, J.R.R.; VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.4, p. 139-143, 1980.
- POOLE, W.D. et al. Foliar fertilisation of soybean. Effect of fertiliser sources, rates and frequency of application. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.195-200, 1983.
- POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. A comparison of organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of plowed and direct drilled soils. **Journal of Agricultural Sciences**, New York, v.97, p.713-721, 1981.

- RAMOS, M.L.G. et al. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Soil**, Dordrecht, v.152, p.145-150, 1993.
- ROUGHLEY, R.J. Environmental and cultural aspects of the management of legumes and *Rhizobium*. In: ADVANCES in legume sciences. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p. 97-103.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; van BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.4371-4373, 1993.
- SADOWSKY, M.J. Competition for nodulation in the soybean/*Bradyrhizobium* symbiosis. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Madison: Horizon Scientific Press, 2000. p.279-293.
- SANTOS, M.A. **Caracterização genotípica e fenotípica de estirpes de *Bradyrhizobium* noduladoras de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) isoladas da região dos Cerrados**. Londrina: UEL, 1998. 81f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1998.
- SATO, M.L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; van BERKUM, P. Verification of strain identify in Brazilian soybean inoculants by using the polymerase chain reaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Philadelphia, v.15, p.387-391, 1999.
- SCOTTI, M.R.M.L.; NEVES, M.C.P.; DOBEREINER, J.; PAIVA, E. Competitive and proteic alterations in *Bradyrhizobium japonicum* strains after contact with soybean root (*Glycine max* (L.) Merrill). **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.65, p.427-438, 1993.
- SELBACH, P.A. **Efeito da incorporação de cobertura vegetal sobre o nitrogênio inorgânico e sobre a população microbiana do solo e sua inter-relação com a fixação de N₂ da soja (*Glycine max* [L.] Merrill)**. 1978. 86f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em ciência do solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 1978.
- SMITH, G.B.; WOLLUM II, A.G. Nodulation of *Glycine max* by six *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitive abilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1957-1962, 1989.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.
- SPRENT, J.I. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. In: NUTMAN, P.S. (Ed) **Simbiotic nitrogen fixation**. Cambridge: University Press, 1976. p.405-420.

- STALEY, T.E. et al. Soil microbial biomass and organic component alterations in a no-tillage chronosequence. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.52, p.998-1005, 1988.
- STAMFORD, N. et al. Fixação do N₂ e matéria seca do caupi em dois solos de semi-árido brasileiro submetido à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.283-290, 1990.
- STANLEY, J.S.; BROWN, G.G.; VERMA, D.P.S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.163, p.148-154, 1985.
- STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v.7, p.1-23, 1988.
- SVENNING, M.M. et al. Differential rates of inhibition of N₂ fixation by sustained low concentrations of NH₄⁺ and NO₃⁻ in northern ecotypes of white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.47, p. 729-738, 1996.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5.)
- TRINICK, M.J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J. M. (Ed.) **Nitrogen fixation in legumes**. Sydney: Academic Press, 1982. p.229-237.
- TRIPLETT, E.W.; BARTA, T.M. Trifotoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. **Plant Physiology**, Baltimore, v.85, p.335-342, 1987.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v.46, p.399-428, 1992.
- VAN KESSEL, C.; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?. **Field Crops Research**, London, v.65, p.165-181, 2000.
- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, London, v.19, p.91-101, 1988.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C et al. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 83p.

- VENKATESWARLU, B. et al. Effects of water deficit on $N_2(C_2H_2)$ fixation in cowpea and groundnut. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 114, p.69-74, 1989.
- VESPER, S.J.; BAUER, W.D. Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. **Symbiosis**, Philadelphia, v.1, p.139-162, 1985.
- VIDOR, C. Symbiotic dinitrogen fixation. In: RUSSEL, R.S. et al. (Eds.) **The soil/root system in relation to Brazilian agriculture**. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná/IAPAR, 1981. p.199-221.
- VIDOR, C.; BROSE, E.; PEREIRA, J.S. Competição por sítio de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.15, p.227-238, 1979.
- VINCENT, J.M. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W.E.; ORME-JOHNSON, W.H. (Eds.) **Nitrogen Fixation: Vol II. Symbiotic Associations and Cyanobacteria**. Baltimore, MD: University Park Press, 1980. p.103-129.
- VINCENT, J.M. **Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- VOSS, M.; SIDIRAS, N. Nodulação da soja em plantio direto em comparação com plantio convencional. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.20, p.775-782, 1985.
- WALKER, D.W.; MILLER JR., J.C. Influence of water stress on nitrogen fixation in cowpea. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.111, p.451-458, 1986.
- WANG, S.P. ; STACEY, G. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.223, p.329-331, 1990.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effects of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merril. I. Greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, p.229-232, 1974.
- WOJTASZEK, P. et al. Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of the intact white lupin (*Lupinus albus* L.) plants. **Journal of Plant Physiology**, London, v.142, p.689-694, 1993.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Atributos químicos de um PVd (camada de 0-20cm) submetido a adubação mineral (com e sem irrigação) e orgânica, em três sistemas de preparo do solo. Amostragem efetuada após a colheita da soja (maio/2001)

Tratamento		pH	Al _{troc.}	Ca _{troc.}	Mg _{troc.}	M.O.	P	K
			----- cmol _c L ⁻¹ -----			%	----- mg L ⁻¹ -----	
Adubação Mineral Irrigado								
Bloco I	PD	6,0	0,0	8,7	3,9	2,8	3,6	151
	PR	6,4	0,0	7,3	3,6	2,6	9,7	186
	PC	6,1	0,0	9,8	4,7	2,5	5,1	177
Bloco II	PD	5,9	0,0	7,0	3,4	2,6	3,9	175
	PR	6,1	0,0	7,2	3,5	3,0	2,5	174
	PC	6,1	0,0	4,1	1,9	2,6	2,4	175
Adubação Mineral								
Bloco I	PD	5,7	0,0	5,0	2,3	3,0	2,8	164
	PR	6,1	0,0	5,3	2,4	2,8	2,9	199
	PC	6,0	0,0	9,5	4,6	2,7	7,1	194
Bloco II	PD	5,6	0,0	4,6	2,1	2,8	1,9	133
	PR	5,8	0,0	4,8	2,3	2,7	2,2	160
	PC	6,0	0,0	4,9	2,3	2,6	2,4	157
Adubação Orgânica								
Bloco I	PD	5,4	0,2	4,4	2,5	2,9	7,5	168
	PR	5,4	0,1	2,4	1,1	3,1	7,0	178
	PC	5,4	0,2	4,0	1,9	2,6	3,7	142
Bloco II	PD	5,6	0,0	9,5	4,4	3,0	9,0	178
	PR	5,5	0,1	5,1	2,5	3,0	8,0	196
	PC	5,6	0,0	9,5	4,6	2,7	7,1	194
Campo Nativo		5,2	0,4	6,4	3,0	2,5	1,5	127

APÊNDICE 2. Análise química da cama de aviário

Determinações	Teores
Umidade - %	22,5
Carbono Orgânico - %	30
Nitrogênio (TKN) - %	1,8
Fósforo total - %	1,1
Potássio total - %	1,9
Cálcio total - %	8,1
Magnésio total - %	0,56
Enxofre total - %	0,40
Cobre total - mg kg ⁻¹	61
Zinco total - mg kg ⁻¹	454
Ferro total - %	0,11
Manganês total - mg kg ⁻¹	448
Sódio total - %	0,76
Boro total - mg kg ⁻¹	17

Resultados expressos em material seco a 75°C.

APÊNDICE 3. Precipitação e ETo-evapotranspiração de referência determinados no período de julho a junho dos anos agrícolas 2000/2001 (a) e 2002/2003. ETo calculada pela equação de Penman

