DINÂMICA DA NODULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE *Bradyrhizobium*
japonicum E PRODUÇÃO DE SOJA A CAMPO

SILENE CRISTINA DE LIMA

Bióloga

Orientador: Dr. ELI SIDNEY LOPES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Microbiologia Agrí-
cola.

Piracicaba

Estado de São Paulo - Brasil

outubro - 1995

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Lima, Silene Cristina de

Dinâmica da nodulação, caracterização de Bradyrhizobium japonicum
e produção de soja a campo. Piracicaba, 1995.

75p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Nitrogênio em soja - Fixação
3. Rizóbio - Nodulação 4. Soja - Inoculação 5. Soja - Produção I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.34

DINÂMICA DA NODULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE *Bradyrhizobium*
japonicum E PRODUÇÃO DE SOJA A CAMPO

SILENE CRISTINA DE LIMA

APROVADA EM 13/12/95

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Eli Sidney Lopes

IAC/Campinas

Prof^a Dr^a Elke J.B.N. Cardoso

ESALQ/USP

Prof^a Dr^a Eliana G.M. Lemos

UNESP/Jaboticabal

Dr. Eli Sidney Lopes

- Orientador -

”Não conto gozar a minha vida, nem em gozá-la penso. Só quero torná-la grande, ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a (minha alma) a lenha desse fogo”.

(Fernando Pessoa).

Dedico,

Aos meus pais, Israel e Clarice, com a maior das gradidões
À Imaculada, Inês, Clara, Cleide, Luiz e Francisco, meus
irmãos queridos

A G R A D E C I M E N T O S

Ao pesquisador Dr. Eli Sidney Lopes, pela amizade, confiança e orientação.

Ao pessoal da Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas, pela amizade e colaboração na execução deste trabalho.

À Cooperativa dos Agricultores da Região de Orllândia (CAROL) pelo auxílio financeiro e em especial ao Eng^o Agrônomo André Luis Pazzeto, pela colaboração e apoio na experimentação a campo.

Ao Depto de Tecnologia da UNESP/Jaboticabal, pelos soros fornecidos.

À professora Dr^a Eliana G. M. Lemos, pela amizade, orientação e pela oportunidade de realização de parte deste trabalho, no laboratório do Depto de Tecnologia da UNESP/Jaboticabal,

À Dr^a Lúcia M. C. Alves e ao João Carlos Campanharo, do Depto de Tecnologia da UNESP/Jaboticabal, pela amizade e apoio neste trabalho.

Ao Eng^o Agrônomo Nilo Ikuta, do Centro de Biotecnologia/UFRGS, pela orientação do estágio, durante a realização deste trabalho.

Ao Gabriel Sàrriez e a Sônia Maria De Stefano
Piedade do Depto de Matemática e Estatística da ESALQ/USP,
pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

À ESALQ/USP, pela oportunidade de estudo.

À FAPESP, pela bolsa fornecida durante o
curso.

À grande amiga, Bióloga Patrícia Augusto de
Oliveira, pela participação neste trabalho e pelos momentos
de apoio e descontração, nos quais buscávamos "força" para a
caminhada.

Aos colegas Amauri, Denise, Fernando, Karen,
Roberto e Pati, pelas alegrias proporcionadas nestes anos.

Ao Sérgio Paulillo Júnior, pela compreensão,
apoio e presença nestes anos.

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1. Introdução.....	01
2. Revisão de Literatura.....	06
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Área de Estudo.....	13
3.2. Produção do Inoculante.....	14
3.3. Instalação e Condução do Ensaio.....	15
3.4. Coleta de Nódulos.....	16
3.5. Coleta de Grãos.....	16
3.6. Isolamento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	17
3.7. Análises Sorológicas e Bioquímica.....	18
3.7.1. Teste de Aglutinação.....	18
3.7.1.1. Preparo da Amostra.....	19
3.7.2. Caracterização Eletroforética dos Isolados.....	19
3.7.2.1. Preparo da Amostra.....	20
3.7.2.2. Preparação do Gel de Poliacrilamida.....	20
3.7.3. Caracterização das bactérias nos nódulos.....	21

4. Resultados e Discussão.....	25
4.1. Produção de Matéria Seca de Parte Aérea.....	25
4.2. Produção de Matéria Seca de Raiz.....	29
4.3. Produção de Matéria Seca de Nódulos.....	31
4.4. Número de Nódulos.....	32
4.5. Produção e Nitrogênio nos Grãos.....	38
4.6. Isolamento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	40
4.7. Análises Sorológicas e Bioquímica.....	42
4.7.1. Teste de Aglutinação.....	42
4.7.2. Caracterização Eletroforética dos Isolados.....	45
4.7.3. Caracterização das bactérias nos nódulos...	50
5. Conclusões.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
- Apêndice 1.....	70
- Apêndice 2.....	70
- Apêndice 3.....	73

DINÂMICA DA NODULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* E PRODUÇÃO DE SOJA A CAMPO

Autor: *Silene Cristina de Lima*

Orientador: *Dr. Eli Sidney Lopes*

RESUMO

Fez-se um estudo sobre competição e dinâmica de ocupação dos sítios de nodulação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* naturalizadas ou inoculadas nas sementes, em Latossolo Vermelho Escuro. Esse estudo foi conduzido em propriedade particular (Fazenda Invernada), numa área de rotação soja/cana-de-açúcar, em São Joaquim da Barra, SP. O ensaio foi instalado em blocos ao acaso, com 8 repetições dos seguintes tratamentos: A) Controle sem inoculante; B) Controle sem inoculante, com adubação nitrogenada; C) Inoculante com cerca de 10^7 rizóbios/g (8g/kg de sementes); D) Inoculante com cerca de 10^{10} rizóbios/g (8g/kg de sementes); os inoculantes foram preparados com as estirpes recomendadas: SMS-314 (=SEMIA-587) e SMS-463 (=SEMIA-5019= 29W). As amostragens do sistema radicular foram feitas aos 10, 28, 42, 56, 70 e 85 dias da germinação, para a avaliação do número e matéria seca de nódulos, e isolamentos das estirpes naturalizadas de rizóbios. A identificação das estirpes formadoras dos nódulos foi realizada em amostras coletadas aos 10, 42 e 70 dias após a

germinação. Realizou-se também a colheita dos grãos para avaliação da produção e de N-total. A tipificação sorológica foi feita com antissoro preparado a partir de antígenos constituídos pelas seguintes estirpes de *B. japonicum*: SEMIA-587, SEMIA-5019 e SEMIA-5052 (=USDA-6), utilizando-se da técnica de "imunodot".

Para as variáveis peso de matéria seca de raiz, de parte aérea, número de nódulos e produção de grãos e de N-total não se encontraram diferenças significativas entre médias dos tratamentos. A caracterização das estirpes dos nódulos das amostragens feitas aos 10, 42 e 70 dias após a germinação, revelou um pequeno aumento (6,2 a 8,7%), na ocorrência de nódulos formados pelas estirpes recomendadas, nas três épocas de amostragens. Houve expressiva participação da estirpe 5052 (sorogrupo USDA-6) na formação dos nódulos, com um aumento no final do ciclo sugerindo, além da sobrevivência, uma maior competitividade dessa estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* naturalizada, ou seja previamente introduzida. Verificou-se também que as estirpes naturalizadas podem contribuir de forma diferente na formação dos nódulos durante o ciclo, dependendo da época de amostragem.

DYNAMICS OF NODULATION, CHARACTERIZATION OF *Bradyrhizobium japonicum* AND PRODUCTION OF SOYBEANS IN FIELD

Author: *Silene Cristina de Lima*

Adviser: *Dr. Eli Sidney Lopes*

SUMMARY

A study on competition and on dynamics of occupation of nodulation sites of the naturalized and seed inoculated strains of *Bradyrhizobium japonicum* was made in Dark Red Latosol. This study was made at a private property Invernada farm, in an area of soybeans/sugar-cane rotation, in São Joaquim da Barra, SP. The experimental design was randomized blocks, with eight replications of the following treatments: A) Control without inoculation; B) Control with nitrogen fertilizer, without inoculation; C) Peat - inoculant with about 10^7 rhizobia/g (8g/kg of seed); D) Peat - inoculant with about 10^{10} rhizobia/g (8g/kg of seed). The inoculant were prepared with the strains SMS-314 (=SEMIA-587) and SMS-463 (=SEMIA-5019=29W), officially recommended for inoculant production. Samples of the root system were collected at 10, 28, 42, 56, 70 and 85 days of germination, to evaluate the number and dry matter of nodules, and to isolate naturalized rhizobia. The identification of the strains which formed nodules was made

in the samples collected at 10, 42 and 70 days after seed germination. The grains were harvested to evaluate production and nitrogen. Sorological typification was made with antiserum prepared from antigens constituted by the *B. japonicum* strains SEMIA-587, SEMIA-5019 and SEMIA-5052 (=USDA 6), using the "immunodot" technic.

No significative differences between treatments were observed in dry matter root weight, aerial part, nodules number and grain production and total N. The characterization of the strains on nodules of the samples collected 10, 42 and 70 days after the germination revealed a small increase (6.2 to 8.7%), in the occurrence of nodules formed by the recommended strains, in the three sampling times. There was an expressive participation of the strain 5052 (serogroup USDA-6) in the formation of the nodules and an increase by the end of the cropping cycle suggesting great survival and competitiveness of this naturalized (previously introduced) strain of *Bradyrhizobium japonicum*. It was also observed that the naturalized strains may contribute differently to the formation of the nodules during the cycle, depending on the time of sampling.

1. INTRODUÇÃO

Nos países do terceiro mundo, os fertilizantes nitrogenados são frequentemente limitados e caros (GRAHAM & TEMPLE, 1984). Portanto é importante que para o cultivo de leguminosas se faça uso eficiente da simbiose dessas plantas com rizóbios para que a fixação biológica possa ser uma alternativa adequada de suprimento de nitrogênio. A fixação biológica do nitrogênio é um dos componentes da chamada tecnologia de baixos insumos, mediante a qual se pretende obter rendimentos adequados sem necessidade de realizar investimentos custosos de insumos, através do uso de variedades tolerantes a fatores adversos do ambiente, aproveitamento das fontes naturais e da reciclagem de nutrientes, (SALAMANCA *et alii*, 1989). A fonte natural de nitrogênio no processo biológico de fixação é a atmosfera, praticamente inesgotável. A fixação de nitrogênio normalmente pressupõe o emprego de inoculantes com estirpes selecionadas de rizóbios. No Estado de São Paulo, a soja é praticamente a única leguminosa cultivada para a qual existe uma consciência da necessidade de inoculação (LOPES & GIARDINI, 1981).

A soja foi introduzida no Brasil no século passado, e sua produção comercial despontou na década de cinquenta, no Rio Grande do Sul, obtendo importante papel na economia do país, principalmente a partir da década de setenta (GOMES, 1990). Atualmente o Brasil é o segundo maior

produtor mundial de soja. Dentre as contribuições da pesquisa para o adequado manejo de cultura da soja e do solo, destacam-se: seleção de estirpes eficientes de rizóbios, plantio direto, controle de ervas daninhas, insetos-praga e doenças (KASTER & BONATO, 1980).

Embora não haja estatísticas, é de se supor que a maior parte do suprimento do nitrogênio dessa leguminosa seja feito através da fixação biológica do N_2 . A importância desse processo pode ser avaliada considerando-se o fato de que a soja é o único vegetal plantado em larga escala, cuja proteína pode substituir a proteína de origem animal (CARRÃO & PANIZZII, 1987 in GALLI, 1987). No ano de 1992 foi cultivada uma área de 465.621 ha de soja no Estado de São Paulo (FIBGE, 1993). Considerando-se a média de 6,4 % de N nas sementes e a produtividade média de grãos de 2,1 ton/ha, a extração de N naquela área corresponde à 62.579,5 ton.. Considerando um custo de US\$ 16.800,00 por ton de nitrogênio pode-se calcular que a economia com a adubação nitrogenada no Estado de São Paulo é no mínimo da ordem de 474 milhões de dólares, sem considerar que a eficiência do aproveitamento do nitrogênio do adubo nitrogenado não ultrapassa a 50 %.

Uma das etapas mais importantes da seleção de estirpes de rizóbio para inoculantes é a capacidade para formar simbiose efetiva em condições de campo com o hospedeiro para o qual o inoculante é recomendado (AMARGER, 1981). Tem se observado que com a inoculação sucessiva de

rizóbios nas sementes de soja em determinadas áreas há uma sobrevivência das estirpes dos inoculantes, passando-se obter nodulação espontânea na ausência de novas inoculações. Nos solos do Estado de São Paulo várias estirpes foram introduzidas através da inoculação (LOPES & GIARDINI, 1981). A importância da identificação dessas estirpes nos nódulos formados naturalmente em solos previamente cultivados com soja está relacionada ao interesse de se introduzir novas estirpes de maior eficiência que as que se adaptaram naqueles solos.

Há falta de estatísticas sobre o uso de inoculantes em leguminosas de modo geral e particularmente para a soja. Informações obtidas recentemente junto a produtores e cooperativas no Estado de São Paulo sugerem que poucos agricultores usam inoculantes; num levantamento das estirpes de rizóbios que ocorrem em Latossolo Roxo em áreas previamente cultivada com soja, observou-se a sobrevivência de estirpes, na ausência de novas inoculações (OLIVEIRA, P.A., comunicação pessoal). Por outro lado, as firmas de inoculantes produzem cerca de 12 milhões de pacotes por ano, o que sugere que em outros estados a prática da inoculação deve ser generalizada e deve ter ocorrido em cerca de 55 % da área cultivada em 1993, que foi de 10.644.000 ha (FAO, 1994), considerando o uso provável de 2 pacotes/ha.

Em outros locais tem se constatado que algumas estirpes dos rizóbios nos inoculantes sobrevivem nos solos após cultivos sucessivos ou mesmo após único cultivo da soja

(COWIREDO & DANSO, 1988; ZDOR & PUEPPKE, 1990).

Na maioria dos trabalhos as informações sobre predominância das estirpes normalmente são obtidas em base de uma única amostragem durante o ciclo da cultura, e portanto não avaliam uma eventual sucessão de predominância das estirpes dos inoculantes, ou das já existentes no solo, a partir dos primeiros nódulos formados até a colheita. Esses estudos, no geral, também não levam em conta o potencial de inóculo das estirpes naturalizadas no solo em que os cultivos são efetuados e nem a eficiência dessas estirpes "adaptadas". Quando se tenta introduzir, através da inoculação, novas estirpes em solos com rizóbios já estabelecidos, há necessidade de se caracterizar as estirpes nos nódulos formados, para certificar-se do sucesso da inoculação. A falta de respostas à inoculação, que normalmente se observa, em vários trabalhos, pode estar associada à presença da população naturalizada, que deve ser constituída por estirpes de rizóbios eficazes, introduzidos deliberadamente, através da inoculação em plantios anteriores, e/ou por estirpes introduzidas casualmente, carregadas pelas sementes usadas no plantio.

Este trabalho teve como objetivo verificar a dinâmica da predominância de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em nódulos formados espontaneamente em área previamente cultivada com soja, em função da época de amostragem e verificar "in situ" se as estirpes atualmente recomendadas competem eficientemente com a população

naturalizada, promovendo aumentos na produtividade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Entre os fatores que podem limitar a fixação do nitrogênio e consequentemente a produtividade em *Glycine max* (L.) Merr. encontram-se a competição por sítios nodulares entre estirpes utilizadas nos inoculantes e os rizóbios do solo, quando estas são de menor eficiência. Condições de baixa fertilidade do solo e elevadas doses de nitrogênio combinado, (GRAHAM & TEMPLE, 1984), o efeito da rizosfera, tensão da água, pH do solo, salinidade, temperatura, toxinas e predadores podem também afetar a nodulação e ou a fixação do N_2 de leguminosas junto à vasta variedade de estirpes de rizóbios (KAMICKER & BRILL, 1986).

A soja é uma leguminosa introduzida e uma das poucas espécies que se associa com *Bradyrhizobium japonicum*. Portanto é pouco provável a ocorrência natural dessa bactéria em nossos solos, havendo entretanto possibilidades de que algumas das estirpes introduzidas no solo, juntamente com as sementes ou através de inoculação artificial, sobrevivam e se "naturalizem". Segundo MIYASAKA (1958), o primeiro cultivo experimental da soja no Brasil data de 1882; no Estado de São Paulo, a soja teria sido introduzida por volta de 1892.

A soja é uma leguminosa altamente específica com relação a rizóbios e essa especificidade é verificada também em nível de cultivares. A estirpe CB-1809, por exemplo, não estabelece simbiose com a cultivar IAC-2,

podendo-se afirmar que, praticamente, não há formação de nódulos, (LOPES *et alii*, 1976). VARGAS & SUHET (1980) utilizaram quatro inoculantes preparados com uma estirpe cada um, e efetuaram observações semelhantes com a soja IAC-2 em um solo de primeiro ano de cultivo.

Tem-se verificado nos Estados Unidos que, em solos sem cultivo prévio, há resposta à inoculação, porém em solos anteriormente cultivados, os rizóbios naturalizados são mais competitivos e predominam nos nódulos observados, WEBER *et alii* (1971). ERDMAN (1959), segundo citação de WEBER *et alii* (1971), observou que em solos de Wisconsin, previamente cultivados com soja, ocorrem rizóbios eficientes e ineficientes. No Brasil, PERES & VIDOR (1980) observaram que a competitividade por sítios de infecção nodular, em cultivares de soja, *Glycine max*, (L.) Merrill, por estirpes de rizóbios, é de extrema importância em pesquisas envolvendo seleção de estirpes.

Dentre os métodos utilizados para se conhecer a proporção dos nódulos ocupados pela estirpe de *Rhizobium*, em solos com população nativa ou naturalizada, tem-se utilizado com a maior frequência, análises sorológicas com anticorpos específicos. Pode-se ainda se valer das tipificações com fagos específicos e do emprego de mutantes com algum marcador genético, como é o da resistência a um ou mais antibióticos (SOMASEGARAM & HOBEN, 1985; FUHRMANN, 1993), e também da eletroforese em géis de poliacrilamida (LEMONS *et alii*, 1990).

O uso de mutantes resistentes a antibióticos, geralmente exige dupla marca e por vezes implica perda de eficiência; nem sempre entretanto isso ocorre, e depende da espécie e estirpe de rizóbio. LASSAGNO & FRIORI (1988), por exemplo, notaram que aparentemente as características simbióticas, inclusive a capacidade para fixar nitrogênio de mutantes de *Rhizobium meliloti* resistentes a um antibiótico mantiveram-se com as mesmas propriedades das estirpes selvagens, sendo as mutantes recomendadas para ensaios de persistência e competição no solo. De qualquer forma, o uso de mutantes poderia ser válido para o estudo da estirpe a se introduzir mas não para análise de uma população naturalizada. A tipagem por bacteriófagos seria muito trabalhosa e dependeria de isolamento de vários bacteriófagos com especificidades diferentes. Algumas tentativas de isolamento de bacteriófagos de *Bradyrhizobium sp.* realizada na Seção de Microbiologia do Solo, IAC, não foram bem sucedidas (Lopes, E. S., comunicação pessoal).

A sorologia, através de reações de aglutinações e entre antissoros específicos, foi usada com sucesso por PERES & VIDOR (1980), para determinar a ocorrência de competição por sítio de infecção nodular, em cultivares de soja, por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*.

STAMMER (1973) observou diferenças na representatividade da população de estirpes de rizóbio quando analisou nódulos de diferentes tamanhos, portanto

deve-se tomar cuidado para evitar tendências na amostragem de nódulos para identificação sorológica das estirpes quanto ao tamanho e número de nódulos amostrados.

A eletroforese uni-dimensional em gel de poliacrilamida, para separação de proteínas dos rizóbios foi o método mais eficiente para diferenciar estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isolados de nódulos, quando comparado a sorotipagem; estirpes de um mesmo sorogrupo mostraram padrões eletroforéticos de proteínas diferentes (KAMICKER & BRILL, 1986; LEMOS, 1994). DATE & DECKER (1965) observaram para reações de aglutinação de 28 estirpes de rizóbios, que 17 sorogrupos puderam ser reconhecidos.

KOLLING *et alii* (1984) observaram que, mesmo em solo que ficou em "pousio" durante três anos, as estirpes naturalizadas apresentaram sobrevivência e eficácia quando da reimplantação do hospedeiro. Isto foi confirmado por identificação sorológica verificada no tratamento sem inoculação. A inoculação não alterou a proporção de ocupação dos sítios de nodulação.

ZDOR & PUEPPKE (1990) estudaram a competitividade, de *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes números USDA-123 e USDA-138 (sorogrupo 123 e sorogrupo c1, respectivamente, conforme conceituação de DATE & DECKER, 1965) em solos que continham rizóbio nativo. A inoculação com essas estirpes aumentou a sua ocupação nodular e alterou a distribuição dos sorogrupos nos nódulos, mas o número total de nódulos não aumentou; as estirpes nativas de

Bradyrhizobium japonicum de sorogrupos distintos do 123 e do 138, ocuparam uma porcentagem significativa de nódulos. A capacidade de competir dessas estirpes foi influenciada pelo sistema de cultivo, pelos rizóbios dos inoculantes, e por fatores do solo.

A influência do sistema de cultivo pode ser exemplificada com os dados obtidos num estudo sobre capacidade competitiva de *Bradyrhizobium japonicum* estirpes E104, E109, E110 (INTA, Castelar, Argentina) em presença de fertilizante nitrogenado (MARTENSSON *et alii*, 1989). Foi verificado em casa de vegetação, que as estirpes E104 e E109 fizeram aumentar a produção de matéria seca mesmo em presença do fertilizante nitrogenado em níveis elevados, o que não ocorreu com a estirpe E 110 em nenhum dos níveis. Entretanto, nas plantas inoculadas com E 110 a produção da matéria seca só aumentou na dose mais baixa de N (5g/m^2) e com o aumento do fertilizante a matéria seca diminuiu, mostrando que a estirpe E 110 é sensível a altos níveis de nitrogênio. A estirpe E 104 poderia ser recomendada para inoculação em solos ricos em nitrogênio, caso a população nativa fosse menos competitiva que ela e não tolerante a altos níveis de N. GALHARDO ARRIGADA (1989), em experimento em casa de vegetação, observou que a soja IAC-8 inoculada com a estirpe SEMIA-5019 (29 W), também suprida de nitrato (5,0 mM continuamente) em solução nutritiva, apresentou ganhos de matéria seca e de nitrogênio na parte aérea em comparação com as plantas inoculadas sem nitrato. A

atividade da redutase do nitrato também foi maior nas plantas que receberam nitrato.

Segundo RUSCHEL & FREITAS (1969) a vagem e nódulos em soja são formados com maior proporção de nitrogênio "novo" do que do advindo da mobilização de partes vegetativas da planta; daí a importância da fixação contínua e prolongada na produção da soja. Quanto à influência de fatores do solo, tem se observado em determinadas condições um efeito negativo do boro e positivo do molibdênio no desenvolvimento dos nódulos de soja, (RUSCHEL *et alii*, 1969). Vários exemplos, com influência de outros nutrientes, com diversas leguminosas foram relatados por WERNER, (1984).

É importante levar-se em conta o histórico do terreno nas amostragens, particularmente quanto ao uso de defensivos, já que a soja é uma das culturas que emprega muitos produtos químicos no controle das plantas daninhas e das doenças.

Na soja "Davis" e "Paraná", CAMPO *et alii* (1984) não observaram efeitos negativos de vários fungicidas sobre o número e peso seco de nódulos e porcentagem de nitrogênio nas plantas.

MACEDO & OLIVEIRA (1988) mostraram que a aplicação de trifluralina (dose de 2,41/ha) na cultivar IAC-8 em solo argiloso diminuiu o peso da parte aérea, dos nódulos e das raízes, mas não afetou o número de nódulos nem o rendimento da soja. LOPES *et alii* (1971) também não encontraram influência dos herbicidas EPTC e Trifluralin, na

formação dos nódulos, quanto ao peso de matéria seca, em raízes de feijão e, apesar de não encontrarem efeitos significativos dos herbicidas na produção de grãos, notaram aumento considerável de produção, ao redor de 190 g a mais por 10m².

MORAES (1989) observou que Metribuzin aplicado em doses crescentes nos cultivos com a soja cv. Paraná, provoca aumento de fitotoxicidade. Nas doses mais elevadas a nodulação, assim como matéria seca total, área foliar e a eficiência de conversão de energia solar em matéria seca, foram também reduzidas.

De acordo com CIAFARDINI & BARBIERI (1987) a inoculação de sementes de soja resulta, em solos argilosos sem *Bradyrhizobium japonicum* nativo, em nódulos formados principalmente na raiz principal e nas porções iniciais da raiz secundária, devido à baixa mobilidade da bactéria no solo. Os mesmos autores observaram que a inoculação através da água de irrigação, em plantas com 30 dias, no estágio v₃, permitiu a colonização da rizosfera inteira e a infecção das raízes secundárias e adventícias pelo simbiote. A biomassa dos nódulos quase dobrou, e a atividade da nitrogenase foi maior e houve aumento da produção da soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de uma área experimental foram amostradas onde se instalaram tratamentos com e sem inoculação da soja IAS-5, para determinação da curva de nodulação em função do tempo, e avaliação sorológica de ocorrência de estirpes de sete diferentes sorogrupos de *B.japonicum*.

3.1. ÁREA DE ESTUDO

Foi escolhida uma propriedade particular na qual se iria cultivar soja. A propriedade -Fazenda Invernada- situa-se no município de São Joaquim da Barra, SP, cujo proprietário é o Sr. Armando Diniz Junqueira. Nesta Fazenda a soja é cultivada sob sistema rotação soja/cana-de-açúcar sendo que a cana vinha sendo cultivada por 6 anos consecutivos, sem adubação química, aplicando-se apenas vinhaça, na base de 40.000l/ha/ano. No ano da instalação do experimento fora, entretanto, feita a calagem pelo próprio produtor, com aplicação de 2.000kg de calcáreo por hectare. No dia da escolha do local, coletaram-se amostras de solo da área onde iria ser instalado o ensaio, para fins de análises e definição da adubação necessária.

O solo da área escolhida foi devidamente identificado pela Seção de Pedologia do Instituto Agrônomo de Campinas, sendo um latossolo vermelho escuro. As análises

químicas estão indicadas no quadro 1.

Quadro 1. Composição Química do solo da área de São Joaquim da Barra - SP.

P	M.O.	pH	K	Ca	Mg	H+Al	S	T	V
$\mu\text{g}/\text{cm}^3$	%	(CaCl_2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	%
21	2,4	5,6	0,22	2,8	1,2	2,2	4,22	6,4	66

3.2. PRODUÇÃO DO INOCULANTE

Preparou-se o inoculante a ser utilizado nos tratamentos com uma mistura das estirpes *B. japonicum* SMS-314 (=SEMI A-587) e SMS-463 (=SEMI A-5019=29W), na época as únicas recomendadas para o uso em inoculantes comerciais. As estirpes foram previamente testadas quanto a pureza, sendo posteriormente cultivadas em meio líquido - YM, (vide apêndice 1), sob agitação até final da fase exponencial. Em seguida a suspensão com as bactérias foi injetada em turfa, previamente esterilizada com irradiações γ 5 Mrads, em sacos plásticos, até um teor de umidade equivalente a 35%.

No dia anterior ao da instalação do ensaio fez-se uma contagem total de células, com 6 repetições, em cada inoculante, pelo método de diluição e inoculação de gotas em placa, conforme MILE & MISRA (1932) modificado, citado por VINCENT, (1970). Os inoculantes foram então misturados em quantidades tais que permitissem concentrações

iguais das estirpes na mistura. O inoculante a ser usado no tratamento D, indicado a seguir continha cerca de $1,8 \times 10^{10}$ células/g de turfa, (que será referido como 10^{10}) e o que foi usado no tratamento C, $9,8 \times 10^6$ células/g de turfa (que será referido como 10^7).

3.3. INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO

O ensaio foi instalado em blocos ao acaso, com 8 repetições dos seguintes tratamentos:

- A- Sem inoculante
- B- Sem inoculante e com adubação nitrogenada
- C- Inoculante com 10^7 células/g
- D- Inoculante com 10^{10} células/g

Cada parcela constava de 6 linhas de 42 metros de comprimento e a quantidade total de grãos utilizada foi de 45 kg, da cultivar IAS-5.

O inoculante utilizado foi na base de 8 g/kg de semente. No momento do plantio foi feita uma suspensão do inoculante em sacarose 10% e então misturou-se aos grãos.

Nas parcelas do tratamento com N foi feita uma aplicação de uréia em cobertura 20 dias após o plantio, na dose de 60 kg/ha.

3.4. COLETA DE NÓDULOS

Fez-se amostragem do sistema radicular aos 10,28,42,56,70 e 85 dias da germinação para avaliações sorológicas e eletroforéticas das estirpes formadoras desses nódulos e também para isolamentos. Em cada coleta foi feito previamente um sorteio das linhas a serem amostradas de cada parcela e amostragem. Amostraram-se 2 plantas por parcela e coletaram-se os nódulos para contagem e determinação de matéria seca. Foi também determinada a matéria seca da parte aérea e raiz, sendo que a matéria da parte aérea foi moída para analisar o N-total, pelo método Kjeldahl.

O número de plantas arrancadas de cada parcela variou de 2 a 5 durante as amostragens, retirando-se 100 nódulos por parcela, totalizando-se 800 nódulos por tratamento em cada amostragem.

No laboratório os nódulos foram destacados das raízes e guardados em frascos de vidros com solução aquosa de glicerol a 20% e mantidos a temperatura de -20°C , em freezer.

3.5. COLETA DE GRÃOS

Aos 113 dias do plantio realizou-se a coleta dos grãos. Para a avaliação da produção colheram-se as plantas de duas linhas centrais de cada parcela (5m de cada). Essas plantas foram trazidas para Campinas

devidamente identificadas, e mantidas na casa de vegetação por sete dias para secagem. Posteriormente, elas foram trilhadas, separando-se assim os grãos dos restos de planta. Os resíduos foram eliminados. Os grãos foram pesados e os dados obtidos convertidos para kg/ha.

Foi também feita a análise de N-total nos grãos, pelo método Kjeldahl.

3.6. ISOLAMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum*

Fez-se isolamentos de *B. japonicum* a partir de nódulos de acordo com a técnica proposta por SOMASEGARAM (1980). Os nódulos do tratamento controle (A) foram previamente desinfestados em solução de hipoclorito de sódio 3:1, durante 4 minutos e em seguida lavados por 6 vezes com água esterilizada. Os nódulos foram transferidos para tubos de ensaios com cerca de 2 ml de água esterilizada e macerados com auxílio de um bastão de vidro, obtendo-se assim uma suspensão de bactérias a qual foi riscada em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (vide apêndice 1). Em seguida foram incubadas por 7 a 10 dias a 28°C.

Fez-se 60 tentativas de isolamentos dos nódulos, do tratamento A (controle), sendo 10 tentativas em cada amostragem. A pureza foi observada em base a comprovação de colônias isoladas de prováveis rizóbios de um único tipo, após riscagens sucessivas em placa com meio YMA. As culturas consideradas puras foram armazenadas em tubos

com meio de cultura YMB (vide apêndice 1) sob óleo.

3.7. TESTES SOROLÓGICOS E BIOQUÍMICO

Para identificação das estirpes nos nódulos foram feitos testes sorológicos com estirpes isoladas a partir de nódulos (aglutinação e eletroforese) e com nódulos intactos utilizando-se a técnica "immunodot" (OLSEN & RICE, 1989).

Foram testados pelo menos 10 nódulos de cada uma das oito repetições de 3 tratamentos (controle = A; inóculo com 10^7 riz./g = C e com 10^{10} riz./g = D) coletados em 3 épocas de amostragem (10, 42 e 70 DAG), através da técnica de "immunodot"

3.7.1. TESTE DE AGLUTINAÇÃO

Para identificação das estirpes isoladas, a partir de nódulos, foram feitos testes sorológicos de aglutinação.

Foram testados 37 isolados do tratamento A (controle) contra antissoros de células inteiras de *B. japonicum*, pertencentes a sete sorogrupos distintos, que são:

Sorogrupo II - SEMIA 5025

Sorogrupo III - SEMIA 587

Sorogrupo IV - SEMIA 5019

Sorogrupo V - SEMIA 5080

Sorogrupo VI - SEMIA 566

Sorogrupo VII - SEMIA 5032

Sorogrupo IX - SEMIA 518 (LEMOS, comunicação pessoal)

Os isolados que apresentaram reações cruzadas e os que não foram identificados com esses antissoros foram submetidos a novo teste de aglutinação, com antissoros produzidos com lipopolissacarídeos de *B. japonicum* dos seguintes sorogrupos: II, III, IV, VI e VIII (SEMIA-5061).

3.7.1.1. PREPARO DA AMOSTRA

De cada suspensão de cultura a 400 unidades klett (= 0,8 nm) retirou-se 1 ml e diluiu-se 1:1 para realizar os testes de aglutinação (ver item 3.7.2.1). Colocava-se a amostra diluída e o antissoro numa proporção também 1:1 em placas de Takatsi, com o fundo em "v" e agitava-se por 3 minutos em um agitador orbital e aguardava-se 24 horas para fazer a observação de aglutinação, em um negatoscópio com fundo branco.

3.7.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS ISOLADOS

As culturas que não foram caracterizadas pelos testes de aglutinação foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida, onde analisou-se o

perfil de seus lipopolissacarídeos, (LEMOS, 1994).

3.7.2.1. PREPARO DA AMOSTRA

As culturas isoladas a partir de nódulos, foram cultivadas em meio de cultura líquido (YMB), durante 4 dias a 28°C, sob agitação, até atingirem a fase log. Depois foram centrifugadas a 1800 x g, 20 min. a 4°C e lavadas em 0,5 ml de NaCl 0,85 % em tubo tipo Eppendorf, centrifugadas por 5 min. (SPIN I-15.000 rpm). O precipitado foi ressuspendido em 0,5 ml de NaCl 0,85 % e transferido a um outro tubo com 5 ml de solução salina (NaCl- 0,85 %) até atingir 400 unidades klett (1ml para o teste de aglutinação e 4ml para eletroforese). Retirou-se 1ml dessa suspensão e transferiu-se para tubos com tampas de borracha e levou-se ao banho-maria por 45 min. a 95°C. Posteriormente centrifugou-se a 15.000 rpm (SPIN I, 5 min.) e retirou-se 0,4ml do sobrenadante e adicionou-se 0,1ml de tampão da amostra de lipopolissacarídeo (apêndice 2), levou-se a fervura por 8 min., estando assim pronta para análise eletroforética. Aplicou-se de 70 a 75 µl da amostra nas canaletas do gel.

3.7.2.2. PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

O gel de poliacrilamida continha 1% em SDS utilizando-se 5% de gel concentrador e 13% de gel de

separação (Apêndice 2). Para isso foram utilizadas placas 18 mm x 16,5mm x 1 mm e a eletroforese foi desenvolvida mantendo-se a corrente constante (20mA) até a entrada do corante no gel de separação, quando então foi aumentada para 25mA e assim mantida até a final da corrida.

Após a eletroforese os géis foram imersos em solução aquosa 40% em etanol e 5% em ácido acético, durante a noite, e submetidos a oxidação com 0,7% de ácido periódico, adicionado à solução fixadora.

Após quatro lavagens sucessivas de 15 min. com H₂O desionizada, os géis foram tratados com o "reagente de cor" (Apêndice 2), lavados com água desionizada (3 x 30 min.) e revelados com solução de formaldeído (Apêndice 2), (TSAI e FRASCH, 1982). Após o aparecimento das bandas (2 a 3 min.) os géis foram lavados rapidamente com água desionizada com 30ml de ácido cítrico 1M, por 30 segundos, segundos, para interromper a ação do revelador. Os géis foram então imersos em água desionizada e fotografados. Todas as etapas do processo de coloração de lipopolissacarídeos foram realizadas sob agitação suave e na ausência de luz.

3.7.3. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS NOS NÓDULOS

Para identificação das estirpes nos nódulos foram feitos testes sorológicos com nódulos intactos utilizando-se a técnica de "immunodot".

Os nódulos foram previamente desinfestados com

hipoclorito de sódio (1:3) e lavados com água estéril. Macerou-os em solução fisiológica (NaCl 0,85%), num volume que variou de 750 a 2000 μ l dependendo do tamanho do nódulo.

Aplicou-se 1-5 μ l da suspensão de nódulos sobre as membranas de nitrocelulose (SIGMA-N-2764). As membranas foram secas à temperatura ambiente e incubou-as durante 15min. em solução bloqueadora composta de leite em pó desnatado (5%) em tampão fosfato (PBS), cuja composição está no apêndice 2. Inativou-se a peroxidase endógena em solução de H₂O₂ por 10min. Lavou-se 3 vezes em solução bloqueadora durante 5min.. As membranas foram então incubadas com o respectivo antissoro (antissoro SEMIA 587 e 5019 diluídos 1:3000 e SEMIA 5052 1:2000) diluído em solução bloqueadora durante 1h., sob agitação moderada e à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS durante 5min. e então incubadas por uma hora com o antissoro anti IgG de coelho, conjugado à peroxidase, diluído 1:3000 em solução bloqueadora, sob agitação e à temperatura ambiente. As membranas foram outra vez lavadas como anteriormente e incubadas em solução de revelação contendo 100 μ l de solução de cloronaftol (vide apêndice 2) + 10 μ l de H₂O₂ 30% + 10ml de Tris 50mM durante 5-10min.. A reação foi interrompida em PBS e as membranas foram secas à temperatura ambiente.

Os antissoros utilizados haviam sido preparados pela equipe do Depto de Tecnologia da UNESP/Jaboticabal. Utilizou-se os antissoros contra SEMIA 587, 5019, e 5052, sendo que a certificação da

especificidade destes antissoros foi feita pela técnica de "immunodot". (quadro 2), onde se testaram os soros contra as culturas de cada estirpe.

Quadro 2. Análise da especificidade dos antissoros com as culturas SEMIA.

Estirpes (SEMIA)	ANTISSORO (SEMIA)			CONJUGADO
	587	5019	5052	
587	+		+	+
5019		+		+
5052			+	

O sinal + indica forte reação

Como o conjugado (controle) apresentou reação positiva com dois antissoros, fez-se a sua adsorção, como mostra-se a seguir:

- retirou-se 100 μ l do conjugado e acrescentou-se em 400 μ l de PBS (diluido 5x);

- retirou-se 1000 μ l de cada cultura (SEMIA 587 e 5019) e centrifugou-as (10.000 rpm/10min.) separadamente, os sobrenadantes foram descartados;

- Adicionou-se 500 μ l do conjugado em um dos tubos com o precipitado de células, ressuspendeu-o; adicionou-se a suspensão no outro tubo, homogeneizando a mistura;

- agitou-se essa mistura (conjugado +

culturas), em agitador tipo gangorra por 4h. a temperatura ambiente;

-em seguida centrifugou-se a mistura (10.000rpm/10min.) e guardou-se o conjugado adsorvido (sobrenadante);

-testou-se esse conjugado, pela técnica de "immunodot" e verificou-se que não mais reagia com os dois antissoros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se a seguir os resultados dos experimentos de campo, instalados em uma região tradicional de cultivo de soja, do Estado de São Paulo, e de laboratório.

As variáveis peso de matéria seca da parte aérea, raiz, de nódulos e número de nódulos das plantas obtidas nas seis amostragens realizadas, foram analisadas estatisticamente. Os dados foram computados, analisados através do SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA (SANEST) e as médias comparadas ao nível de significância de 5%. Com o objetivo de se estudar o comportamento da nodulação em função do tempo, utilizou-se a regressão polinomial em todas as variáveis. Para esta análise considerou-se então o delineamento experimental como blocos casualizados com parcelas subdivididas (Split-plot), com 8 repetições, com os tratamentos de inoculação nas parcelas, e as amostragens, nas sub-parcelas.

4.1. PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA

Para a variável peso de matéria seca de parte aérea não foram encontradas diferenças significativas, ao nível de 5%, entre médias dos tratamentos, quando analisados dentro de cada amostragem. As médias foram ajustadas a uma

regressão polinomial, mostrando assim o comportamento da produção de matéria seca da parte aérea em função do tempo (fig. 1). No apêndice 3 está incluída a tabela 3.1. com as médias originais.

A equação obtida para expressar a curva de produção de matéria seca da parte aérea foi:

$$Y = 0,0023x^2 + 0,1532x - 3,919$$

onde Y = produção (g) e x = época de amostragem.

O coeficiente de regressão para equação foi:

$$r^2 = 97,72\%$$

Figura 1. Produção de matéria seca da parte aérea da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragens, na análise conjunta de todos tratamentos.

Em experimentos de campo é comum observar diferenças significativas, na variável peso de matéria seca de parte aérea em soja, quando se aplica diferentes tipos de inoculantes, ou seja, inoculantes com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* diferentes ou em misturas com estas. ACUÑA *et alii* (1987) encontraram diferenças significativas entre as médias de peso de matéria seca de parte aérea, quando aplicou-se diferentes inoculantes, sendo que os formados com a estirpe CR 514 (SEMIA 5019) e com a CR 506 (TAL 377) foram os que apresentaram as maiores médias de peso de matéria seca da parte aérea, na cv. Júpiter, juntamente com o tratamento com nitrogênio: 15,14 ; 14,35 e 15,22g/pl. respectivamente. Já o tratamento controle (sem inoculação) apresentou uma média de 10,92g/pl.. As plantas foram colhidas quando apresentavam 50% da floração. NISHI & HUNGRIA (1993) também encontraram diferenças significativas entre médias de peso de matéria seca de parte aérea quando aplicaram inoculantes formados por estirpes de *B. japonicum* diferentes. Os inoculantes com a SEMIA 5080 (CPAC 7) ; SEMIA 586 (CB 1809); SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587 apresentaram as maiores médias: 0,72ab; 0,79a; 0,74ab e 0,65ab respectivamente. Para VARELA & AGUDELO, (1986) produção de matéria seca das folhas no início da floração das vagens variou de acordo com a variedade e a distância de semeadura.

Os resultados da análise de N-total na matéria seca de parte aérea (MSPA) de seis amostragens encontram-se na tabela 1. Estes resultados foram analisados

estatisticamente com o objetivo de se compararem as médias dos diferentes tratamentos dentro das épocas de amostragens. Nota-se que os tratamentos A e B (Sem inoculação e Sem inoculação + N) apresentaram maiores porcentagens de N nas folhas, diferindo estatisticamente dos tratamentos inoculados, na 1^a, 3^a e 4^a amostragem.

TABELA 1: Porcentagem de N na parte aérea de soja IAS-5 coletada nas 6 épocas de amostragem, na área de São Joaquim da Barra.

Tratamento(1)	DAG (2)					
	10	28	42	56	70	85
A	4,33ab ⁽³⁾	5,12a	4,31ab	4,89a	3,22a	3,75a
B	4,62a	4,73a	4,61a	4,30ab	2,72a	3,17a
C	3,59bc	4,42a	3,37c	3,44c	3,09a	3,51a
D	3,46c	3,48b	3,54bc	3,61bc	3,27a	3,43a

C.V. = 11,17% (inoculação); 5,16% (amostragem)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;
C = 10^7 riz/g; D = 10^{10} riz/g.

(2) DAG = dias após a germinação

(3) Médias seguidas da mesma letra, para a comparação dos tratamentos de inoculação, em cada época não diferem entre si ($p=0,05$).

Em tratamento com aplicação de N, ACUÑA *et alii* (1987) e NISHI & HUNGRIA (1993) também encontraram altas porcentagens de N nas folhas (3,53% e 40,02mg/pl. respectivamente). No caso dos primeiros autores foi utilizado 150kg N/ha e não houve diferenças significativas estatisticamente entre os tratamentos inoculados; no caso dos segundos utilizaram-se 200kg de N no plantio + 200kg de N no florescimento, e encontraram-se diferenças estatísticas com alguns tratamentos inoculados. OWIREDO & DANSO (1988) relataram, em experimento em casa de vegetação, [utilizando a cv. Williams em 3 solos com diferentes valores de pH], encontraram, para o tratamento não inoculado valores de 34 a 99mg de N/pl. em tratamentos não inoculados, de 112 a 218mg/pl. em inoculados; solos que apresentaram plantas com 34mg N/pl., tinham pH: 4,3 e população de *B. japonicum* nativo de 23 rizóbios/g. Solos com pH 5,4 e 6,1 tinham uma população de rizóbios de 330 e 280 cel./g, respectivamente.

4.2. PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DE RAIZ

Para a produção de matéria seca de raiz, também não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos, (Apêndice 3, tabela 3.2.). Foi calculada a seguinte curva (fig.2) para expressar a produção de matéria seca de raiz, onde $Y = -0,00033350x^2 + 0,0604x - 0,99345$, sendo Y = produção de raiz (g), e $r^2 = 94,31\%$.

Figura 2. Produção de matéria seca da raiz da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragens, na análise conjunta de todos tratamentos.

4.3. PRODUÇÃO DA MATÉRIA SECA DE NÓDULOS

Não foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, para produção de matéria seca de nódulos, (Apêndice 3, tabela 3.3.). As médias gerais ajustadas a uma regressão quadrática podem ser expressadas pela seguinte equação:

$Y = (-0,000032x^2 + 0,007x - 0,126)1000$, onde Y = matéria seca de nódulos (mg) e o coeficiente de regressão para a equação foi $r^2 = 94,10\%$.

Figura 3. Produção de matéria seca de nódulos da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragens, na análise conjunta de todos tratamentos.

4.4. NÚMERO DE NÓDULOS

Na análise de número de nódulos utilizou-se a transformação, $\sqrt{x + 1}$. Foram encontradas diferenças significativas entre as médias de tratamentos, em duas amostragens, aos 10 e aos 85 dias após a germinação (DAG). Na primeira amostragem o tratamento com adubação nitrogenada apresentou a menor média de número de nódulos diferindo significativamente do tratamento sem inoculação e do tratamento com 10^7 riz./g. Na última amostragem o tratamento com N também apresentou menor nodulação, porém não diferiu do controle. (tabela 2). Houve aumento no número de nódulos da soja até a amostragem dos 56 dias após a germinação, quando a média, considerando os tratamentos inoculados, foi de 50 nódulos por planta. A curva do peso da matéria seca dos nódulos foi diferente da do número de nódulos, onde se observaram incrementos até a última amostragem, aos 85 dias (média de 268,1 mg/planta), embora também não tenham sido detectadas diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação. (Apêndice 3, tabela 3.3.; tabela 2). As médias de número de nódulos de cada tratamento foram ajustados às regressões polinomiais quadráticas, como mostra a figura 4, resultando as seguintes equações que expressam a evolução dessa variável em função do tempo:

$Y = -0,00070x^2 + 0,10125x + 1,209$ ($r^2 = 81,84\%$), para o tratamento sem inoculação (A);

$Y = -0,0014x^2 + 0,190x - 1,505$ ($r^2 = 94,93\%$), para o

tratamento com adubação nitrogenada (B);

$Y = -0,00057x^2 + 0,0915x + 1,226$ ($r^2 = 85,02\%$), para o tratamento com 10^7 riz./g (C), e, $Y = -0,00083x^2 + 0,117x + 0,671$ ($r^2 = 93,51\%$), para o tratamento com 10^{10} riz./g (D), onde Y = raiz quadrada do $n^o + 1$ de nódulos e x = dias após a germinação.

Figura 4. Número de nódulos da variedade de soja IAS-5, em quatro tratamentos, A=controle; B=controle com nitrogênio; C=inoculante com 10^7 células/g e D=inoculante com 10^{10} células/g, observado em seis épocas de amostragens.

Durante os diferentes estádios do desenvolvimento da soja, RUSCHEL & REUSZER (1973) obtiveram diferenças significativas no no. de nódulos por grama de planta. Aos 50, 65, 80 e 95 dias após o plantio aqueles autores encontraram 82,3a ; 59,2b ; 46,3c e 39,1d nod./g de planta respectivamente. Os maiores nódulos foram observados em plantas com 95 dias de idade, indicando que os nódulos de soja são capazes de aumentar seu tamanho até o desenvolvimento vegetativo máximo da planta, mesmo na fase de frutificação.

Tabela 2. Médias de número de nódulos da variedade de soja IAS-5, observadas em seis épocas de amostragem em experimento de inoculação, conduzido no município de São Joaquim da Barra, SP. Médias de 8 repetições.

Tratamento (1)	DAG (2)					
	10	28	42	56	70	85
	-----n ^o /pl.-----					
A	15a ⁽³⁾	24,5a	47,5a	50,5a	36,5a	46ab
B	04b	17,5a	38,0a	56,0a	42,5a	31b
C	15a	20,0a	45,5a	47,5a	41,0a	47,5a
D	11ab	28,5a	34,0a	52,0a	40,0a	39ab

C.V. = 18,11% (inoculação); 6,38% (amostragem)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;
C = 10^7 rizóbios/g; D = 10^{10} rizóbios/g.

(2) DAG = dias após a germinação

(3) Médias seguidas da mesma letra, para a comparação dos tratamentos de inoculação, em cada época não diferem entre si ($p=0,05$).

WEAVER & FREDERICK (1974) em ensaio realizado nos Estados Unidos observaram que mesmo com a estirpe do inóculo formando uma alta porcentagem de nódulos na soja em alguns tratamentos, a produção de sementes e matéria seca não aumentaram com a inoculação.

O número e peso de matéria seca de nódulos, peso de matéria seca das folhas, acúmulo de N e produção de semente dependem da cultivar. VARELA & AGUDELO (1986) estudaram a nodulação espontânea em quatro variedades de soja (ICA Línea 119, ICA Línea 121, ICA Línea 124 e uma variedade comercial ICA Tunía), na Colômbia, utilizando-se um solo com textura argilo-limosa, pH 6,5, de alta fertilidade. Foi observado que o número de nódulos, no início da floração, nas variedades ICA L-121 e ICA L-119 foi maior; na ICA Túnia obteve-se o menor número. A variedade ICA L-121 produziu o maior peso de matéria seca de nódulos, apesar de ser a mais tardia em iniciar a floração. ARRARÁS *et alii* (1986), na Argentina, utilizando inoculante com as estirpes recomendadas, também encontraram diferenças, altamente significativas entre as variedades e o número e peso dos nódulos, sendo que a nodulação foi alta nas variedades de soja Coker Hampton 266A e Bragg. No Rio Grande do Sul, KOLLING *et alii* (1986), utilizando-se de níveis diferentes de inóculo, em solo com população estabelecida, não encontraram diferenças entre os tratamentos ao avaliarem a nodulação, 30 dias após a emergência, o que mostra que a população estabelecida compete eficientemente com a do

inóculo, na formação dos nódulos.

A inoculação de sementes de soja com estirpes eficientes é uma prática agronômica importante, que visa assegurar boa nodulação, fixação de nitrogênio, necessárias para se ter rendimentos elevados e econômicos no cultivo da soja. ACUÑA *et alii* (1987) utilizaram 10 inoculantes preparados com estirpes isoladas ou em combinações na cv. Júpiter e obtiveram resposta diferencial da cultivar às diferentes estirpes e/ou combinações empregadas. Os inoculantes que favoreceram a nodulação continham as estirpes CR 514 (5019), estirpe CR 506 e a combinação das estirpes CR 502, CR 506 e CR 514, cujos pesos de matéria seca dos nódulos por planta foram 0,57g ; 0,55g e 0,49g respectivamente; os menores pesos de nódulos secos foram observados nos tratamentos com 150kgN/ha não houve nodulação, no controle (0,15g) e no do inoculante com a estirpe CR 502 (0,26g).

O peso de matéria seca e o número de nódulos de soja não são critérios satisfatórios para caracterização de estirpes eficientes, (LOPES *et alii*, 1976).

Nos solos tropicais prevalece o baixo pH e altas temperaturas, fatores que podem limitar a sobrevivência dos rizóbios. OWIREDU & DANSO, (1988) coletaram solos de locais onde já havia um histórico de cultivo de soja em Ghana, e montaram um experimento em casa de vegetação no qual foram inoculadas estirpes de *B. japonicum* capazes de crescerem na presença de estreptomicina

(SRJ-S, SX-S e S14-S). Nos solos onde houve inoculação foram observados de 64 a 106 nod./pl. e nos não inoculados de 6 a 11, sugerindo baixa sobrevivência de *B. japonicum*, naqueles solos. Para DANSO *et alii* (1990) a idade, número, distribuição espacial e peso dos nódulos são fatores que influenciam a fixação de N_2 pelas leguminosas. Essa conclusão foi baseada num experimento em casa de vegetação, com solo Typic Eutrocrepts (pH 7,4) com soja cv. Chippewa inoculada com a estirpe J 2 (Nitragim Co : Milwaukee, Wis.) de *B. japonicum*, onde foram observadas diferenças na nodulação devidas aos diferentes tratamentos. Aos 35 dias após o plantio encontrou-se 17 nod./pl. no tratamento com inoculação no plantio; 90 nod./pl. no tratamento com inoculação no plantio e após 14 dias do plantio; 46 nod./pl. no tratamento com inoculação no plantio e após 21 dias.

CIAFARDINI & LOMBARDO (1991) encontraram diferenças no número e peso de matéria seca de nódulos de soja, cv. 'Hogdson', na Sicília, Itália, quando analisaram os tratamentos de inoculação nos anos de 1985, 1986 e 1988; foram obtidos 28; 18 e 8 nódulos/pl. e 810; 440 e 220 mg de matéria seca de nódulos/pl., respectivamente, sendo que no tratamento não inoculado não se encontrou nenhum nódulo. McLOUGHLIN *et alii* (1991) observaram, em experimento de casa de vegetação, que no início do crescimento da soja (cultivares: Williams, Jacques 88 e 103) os tratamentos não inoculados apresentaram deficiência em nitrogênio e tinham menos nódulos que os inoculados, porém aos 80 dias, alguns

dos tratamentos não inoculados estavam bem nodulados e não apresentavam mais deficiência em nitrogênio. Foi observada que a população estabelecida de *B. japonicum* aumentou de 10^3 para 10^6 cel./g, dez semanas após o plantio e que a diferença de N nas parcelas sem inoculação desapareceu com o tempo.

4.5. PRODUÇÃO E NITROGÊNIO NOS GRÃOS

As médias de produção e do total de nitrogênio nos grãos estão apresentadas na tabela 3. A análise estatística do peso de grãos (kg/ha), mostrou que não houve diferenças entre as médias dos tratamentos. A ausência de respostas à inoculação é normalmente observada e pode estar associada a presença de uma nodulação natural eficiente. A média de produção de grãos de soja do Estado de São Paulo, nesta safra (1991/92), foi de 1834 kg/ha, segundo o Anuário Estatístico do Brasil - 1993 (IBGE), portanto verificou-se que a média deste experimento, no tratamento inoculado, foi de pelo menos 1242 kg/ha a mais que a média do Estado, mas não diferiu estatisticamente dos outros tratamentos. Como pode ser observado na tabela 3, a análise estatística dos dados do total de N nos grãos revelou não haver diferenças significativas entre as médias dos tratamentos.

Tabela 3. Produção de grãos de soja (IAS-5) N-total nos grãos, obtidos em São Joaquim da Barra.

Tratamento (1)	Produção de grãos	Nitrogênio nos grãos
	-----kg/ha-----	
A	2914,8	193,6
B	3230,6	211,3
C	3172,1	208,1
D	3076,2	203,6

C. V. =14,66% (produção); C. V. =3,67 (nitrogênio)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;
C = 10^7 rizóbio/g; D = 10^{10} rizóbio/g.

KOLLING *et alii* (1986) também não obtiveram resposta da soja à inoculação com diferentes níveis de inóculo de *B. japonicum*, em solo que ficou em pousio durante três anos. As estirpes naturalizadas haviam sobrevivido e promoveram efetiva nodulação no tratamento sem inoculação. Neste caso também não se verificou resposta significativa da reinoculação na produção, e essa ausência foi atribuída à baixa ocorrência de nódulos formados pelas estirpes dos inoculantes, que não superaram as já estabelecidas no solo, na competição pelos sítios de nodulação.

Para a cultivar Júpiter, ACUÑA *et alii* (1987) encontraram diferenças significativas para a variável produção de grãos, quando utilizava-se inoculantes elaborados com estirpes então recomendadas e outras de *B. japonicum*, ou suas misturas. De modo geral os tratamentos

inoculados apresentaram uma produção de grãos que variou de 2800 a 3475kg/ha ; o tratamento sem inoculação 2675kg/ha e o tratamento com nitrogênio (uma dose de 150kg N/ha), 3075kg/ha. NISHI & HUNGRIA (1993) também não detectaram diferenças significativas a campo entre as estirpes de *B. japonicum* : SEMIA 566, 586, 5079 e 5080, mas todos os tratamentos inoculados apresentaram rendimentos de grãos superiores ao da testemunha com nitrogênio mineral, que recebera 400 kg de N/ha parcelados em duas vezes.

Ao se verificar a produção de grãos de soja cv. Doko, inoculada com a estirpe CB 1809 (HUP⁺) ou 29W (HUP⁻), em vasos, SANTOS *et alii* (1993) observaram uma maior produção com a estirpe CB 1809, sugerindo que a presença do sistema hidrogenase é uma característica desejável para a seleção de estirpes de *B. japonicum* com capacidade de manter elevados níveis de fixação biológica de nitrogênio durante o período crítico de nitrogênio para a cultura, ou seja o período reprodutivo.

4.6. ISOLAMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum*

Das 10 tentativas de isolamento de nódulos coletados do tratamento A (controle) nas diferentes épocas de amostragem, e armazenados por até 7 meses conseguiu-se isolar um total de 37 culturas de rizóbios devidamente comprovados por testes de nodulação. Nenhuma cultura foi isolada dos nódulos (bem pequenos) da primeira amostragem. O

total de culturas obtidas por época está indicada na tabela 4. Através destes isolamentos nota-se que a população estabelecida de rizóbios, neste solo, é relativamente alta, o que pode não reverter à inoculação.

Tabela 4. Número de culturas de rizóbios isoladas de nódulos de soja (IAS-5) amostrado em seis épocas, em ensaio de inoculação, conduzido em São Joaquim da Barra, SP

Época de amostragem (DAG*)	Culturas de rizóbios
	n ^o
10	0
28	2
42	6
56	11
70	9
85	9
TOTAL	37

(*) DAG = Dias após a germinação

4.7. ANÁLISES SOROLÓGICAS E BIOQUÍMICA

As 37 culturas isoladas das cinco últimas épocas de amostragem do tratamento controle foram caracterizadas sorológica e bioquimicamente, através dos testes de aglutinação e de eletroforese, respectivamente.

4.7.1 TESTE DE AGLUTINAÇÃO

As 37 culturas de rizóbios isoladas, foram primeiramente testadas contra sete soros de células inteiras, das seguintes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*: SEMIA 518, 566, 587, 5019, 5025, 5032, 5080. Como pode ser observado na tabela 5, somente duas (5,4%) puderam ser caracterizadas, e são pertencentes ao sorogrupo III (SEMIA 587).

A maioria das culturas apresentou reações cruzadas com anticorpos das estirpes SEMIA 5025, SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 566 e algumas não reagiram com nenhum dos anticorpos. DATE e DECKER (1965) sugeriram que as estirpes de um mesmo grupo de reatividade compartilham determinantes antigênicos comuns, conforme eles observaram quando analisaram 28 estirpes de *B. japonicum*, através da adsorção de soros com as diferentes aglutininas, onde cada antissoro adsorvido foi testado contra todos os antígenos de seu grupo sorológico, portanto isto justificaria as reações cruzadas

aqui obtidas. As culturas que apresentaram reações cruzadas neste trabalho foram submetidas a novo teste com antissoros preparados com lipopolissacarídeos (LPS) destas 4 estirpes e com o da estirpe SEMIA 5061 (sorogrupo VIII). As reações observadas estão apresentadas na tabela 6, onde se pode verificar que antissoros preparados com LPS possibilitam uma melhor caracterização e, conseqüentemente, distinção entre estirpes. O emprego desse antissoro viabilizou a caracterização de mais 19 (54,28%) culturas inicialmente isoladas, sendo cinco com constituição antigênica semelhante a estirpe SEMIA 587 (sorogrupo III). Outras onze puderam ser caracterizadas como SEMIA 5019 (sorogrupo IV) e as três restantes como SEMIA 5061 (sorogrupo VIII), (Tabela 6). As culturas não caracterizadas pelos testes de aglutinação com células inteiras e nem com LPS foram testadas por eletroforese.

Tabela 5 Número de culturas de rizóbios isoladas de nódulos de soja (IAS-5), coletados em seis épocas de amostragem na área de São Joaquim da Barra, caracterizadas, através de teste de aglutinação, com antissoros de células inteiras de *B. japonicum*, produzidos na UNESP/JABOTICABAL,

Épocas(1) de Amostragem	Antissoro (SEMI A) (2)							Nº de Culturas Testadas
	(ND) 518	(VI) 566	(III) 587	(IV) 5019	(II) 5025	(VII) 5032	(V) 5080	
10	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	1	0	0	0	0	2
42	0	0	0	0	0	0	0	6
56	0	0	0	0	0	0	0	11
70	0	0	0	0	0	0	0	9
85	0	0	1	0	0	0	0	9
TOTAL								37

(1) DAG = dias após a germinação

(2) Sorogrupo segundo IPAGRO

ND = Não definido

Tabela 6 Número de culturas de rizóbios isoladas de nódulos de soja (IAS-5) coletados em seis épocas de amostragens na área de São Joaquim da Barra, caracterizadas, através de teste de aglutinação, com antíssoros de lipopolissacarídeo de *B. japonicum*, produzidos na UNESP/JABOTICABAL.

Épocas (1) de Amostragem	Antíssoro (SEMIA) (2)					Total de Culturas Testadas
	(VI) 566	(III) 587	(IV) 5019	(II) 5025	(VIII) 5061	
10	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	1
42	0	1	3	0	1	6
56	0	3	2	0	1	11
70	0	0	3	0	1	9
85	0	1	3	0	0	8
TOTAL						35

(1) Dias após a germinação

(2) Sorogrupo segundo IPAGRO

4.7.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS ISOLADOS

Numa tentativa de melhor caracterizar as 16 culturas restantes fez-se análise de eletroforese, em gel de poliacrilamida, para verificar os perfis de seus LPSs (figura 5) em comparação com os das estirpes de *B. japonicum* de diferentes sorogrupos (figura 6). Convém observar que destas 16 culturas, uma não pode ser submetida à análise, já que se contaminou. Os resultados encontram-se na tabela 7. Verifica-se que com a utilização da eletroforese pode-se caracterizar todas as culturas restantes, o que mostra que o

teste de aglutinação com soros de células totais, por apresentar muitas reações cruzadas, e o teste de aglutinação com soros de LPS, por apresentar reações falsas negativas, podem levar a resultados duvidosos se não forem utilizados em associação com outros métodos de análise. As reações falsas negativas, obtidas no teste de aglutinação com soros de LPS ocorrem, provavelmente, às diferenças já constatadas por Kannenberg *et alii* (1994) na estrutura dos LPSs de bactérias em vida livre, como as mantidas em meios de cultura, e das bactérias na condição de endosimbionte (bacteróide), nos nódulos. Portanto estes soros anti-LPSs não reconheceriam determinantes antigênicos dos bacteróides que deveriam ser correspondentes. Dessa forma a maior ou menor exposição destes determinantes antigênicos na estrutura da membrana poderiam resultar em reações falsas negativas.

Figura 5. Perfil eletroforético em SDS-PAGE de lipopolissacarídeos extraídos de culturas de nódulos de soja (IAS-5), coletados em seis épocas de amostragens na área de São Joaquim da Barra-SP. Canaletas: (1),(3),(5),(7),(8),(9),(10) e (11) estirpes do sorogrupo I (=SEMIA 5052); (2) e (4) estirpes do sorogrupo III (=SEMIA 587); (6) cultura não identificada. Identificação efetuada por comparação com estirpes referenciais (fig. 6).

Figura 6. Perfil eletroforético em SDS-PAGE de lipopolissacarídeos de estirpes referenciais de *Bradyrhizobium japonicum*. Canaletas: (1) LPS padrão de *Escherichia coli*; (2) SEMIA 5019; (3) SEMIA 5001; (4) SEMIA 5061; (5) SEMIA 5013; (6) SEMIA 5018; (7) SEMIA 587; (8) SEMIA 5002; (9) SEMIA 5052; (10) SEMIA 509; (11) SEMIA 5039; (12) SEMIA 5000; (13) LPS padrão *E. coli*; (14) SEMIA 586; (15) SEMIA 5080; (16) SEMIA 5021; (17) SEMIA 566; (18) SEMIA 5079; (19) SEMIA 511; (20) SEMIA 5073; (21) SEMIA 5020; (22) SEMIA 5032; (23) SEMIA 5025 (24) SEMIA 518.

(Cortesia da Profa. Eliana Lemos)

Tabela 7 Número de culturas isoladas de nódulos de soja (IAS-5), coletados em seis épocas de amostragens na área de São Joaquim da Barra identificados através de eletroforese do perfil de LPS, em gel de poliacrilamida.

Épocas (1) de Amostragem	Padrão de Lipopolissacarídeo				Total de Culturas Testadas
	(III) ² 587	(IV) 5019	(I) 5052	ND ⁽³⁾	
10	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
42	1	0	1	0	2
56	3	0	1	0	4
70	0	0	5	0	5
85	0	1	1	2	4
TOTAL	4	1	8	2	15

(1) Dias após a germinação

(2) Sorogrupo segundo IPAGRO

(3) Não determinado

Com os resultados da caracterização dos isolados do tratamento A (controle), tabela 8, pode-se ter um conhecimento dos sorogrupos presentes neste solo, e a partir destes fazer a caracterização dos nódulos com a aplicação do teste de "immunodot", sabendo-se quais antissoros seriam utilizados.

Tabela 8. Porcentagem de presença de sorogrupos de *B. japonicum* em nódulos de soja (IAS-5), formados espontaneamente, no tratamento controle (A). Caracterização realizada pelas técnicas de sorologia (aglutinação) e bioquímica (eletroforese).

Sorogrupo	Antígeno (SEMI A)	%
I	5052	21,6
III	587	27,0
IV	5019	32,4
VIII	5061	8,1
NI *	—	5,4

* NI = não identificado

4.7.3. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS NOS NÓDULOS

Nesta caracterização utilizou-se somente os nódulos coletados em 3 épocas de amostragem, de 3 tratamentos (controle, inóculo com 10^7 riz./g e 10^{10} riz./g).

A caracterização das estirpes dos nódulos das amostragens feitas aos 10, 42 e 70 dias após a germinação, revelou que houve tendência para predominância das recomendadas: SEMI A 587 e 5019 (tabela 9) nas três épocas de

amostragem, tanto nos tratamentos inoculados como não inoculado. Observou-se também um ligeiro aumento (cerca de 8%) na predominância das estirpes recomendadas, devido à inoculação, nas três épocas de amostragem (fig.7). A estirpe SEMIA 5019 mostrou-se mais competitiva que a 587, principalmente nas duas últimas épocas de amostragem, quando a porcentagem de ocorrência dessa estirpe diminuiu consideravelmente. Convém notar que, as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 foram recentemente reclassificadas como da espécie *Bradyrhizobium elkanii*, RUMJANEK *et alii* (1993). Uma característica comum destas estirpes é a de nodularem outras leguminosas tropicais, além da soja. Reações cruzadas de soros de *Bradyrhizobium* spp ("cowpea") com estas estirpes foram recentemente observadas, (LEMOS 1994). Essas observações levou o autor a sugerir que pode estar havendo uma superestimativa da competitividade delas devido a possibilidade de reação dos seus soros com estirpes de *Bradyrhizobium* spp que eventualmente tenham nodulado a soja. Foi também observada uma elevada ocorrência de estirpes não identificadas com os três antissoros empregados, principalmente na primeira amostragem (cerca de 39%). A porcentagem de ocorrência das estirpes não identificadas diminuiu no final do ciclo em função do aumento das estirpes inoculadas (fig.7) e principalmente da USDA-6 (=SEMIA 5052=*Bradyrhizobium japonicum* ATCC 10324, do mesmo sorogrupo da SEMIA 509), também identificada, naturalizada em função de introduções anteriores, desde 1952 (VARGAS *et alii* 1994).

A expressiva participação do sorogrupo USDA-6 na formação dos nódulos e o aumento observado no final do ciclo, sugerem a sobrevivência das estirpes de *B. japonicum* (tabela 8).

Como comentado anteriormente (tabela 2) observou-se uma nodulação natural abundante e sobrevivência das estirpes de inoculações anteriores (fig.8), sendo que os tratamentos de inoculação com as estirpes atualmente recomendadas contribuíram para um ligeiro aumento na ocupação dos nódulos por essas estirpes, (fig.7). A estirpe SMS-463 (=SEMI A-5019=29W) mostrou ser mais competitiva que a SMS-314 (=SEMI A-587). Verificou-se também que as estirpes naturalizadas podem contribuir de forma diferente na formação dos nódulos durante o ciclo, dependendo da época de amostragem (fig.8). Há necessidade de se estudar também metodologias de inoculação que possam aumentar a ocupação nodular da estirpe de interesse.

Figura 7. Porcentagem de nódulos de soja (IAS-5) ocupados pelos sorogrupos I (SEMIA-5052); III (SEMIA-587); IV (SEMIA-5019) e Não Identificado, do tratamento D (inóculo com 10^{10} células/g. Caracterizados pela técnica de "Immunodot", nas 3 épocas de amostragens.

Figura 8. Porcentagem de nódulos de soja (IAS-5) ocupados pelos sorogrupos I (SEMA-5052); III (SEMA-587); IV (SEMA-5019) e Não Identificado, do tratamento A (controle). Caracterizados pela técnica de "Immunodot", nas 3 épocas de amostragens.

Tabela 9. Porcentagem de nódulos com reações positivas pelo teste de "IMMUNODOT", com antissoros de 3 estirpes. Coletados em 3 épocas de amostragem.

DAG ⁽¹⁾	TRATAMENTO ⁽²⁾	ESTIRPE ⁽³⁾			TOTAL DE NÓDULOS TESTADOS	
		587	5019	5052	NI ⁽⁴⁾	
		----- % -----				
10	A	14,19	27,14	25,71	32,86	70
	C	23,75	31,25	23,72	40,00	80
	D	26,25	38,75	11,25	38,75	80
42	A	27,50	33,75	15,00	28,75	80
	C	18,75	47,50	8,75	35,00	80
	D	18,75	46,25	8,75	26,25	80
70	A	10,00	38,75	38,75	11,25	80
	C	17,50	65,00	17,50	15,00	80
	D	16,25	43,75	32,50	11,25	80

(1) DAG = dias após a germinação em que se fez a amostragem

(2) A = controle; C = inóculo c/ 10^7 riz./g e D = inóculo c/ 10^{10} riz./g.

(3) As identificações foram feitas com os antissoros das estirpes indicadas.

(4) NI = não identificado.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos em função dos tratamentos de inoculação da soja e nas condições em que foi desenvolvido o experimento de campo, conclui-se que:

1. A nodulação, promovida pelos rizóbios já estabelecida no solo foi abundante sendo que não foram constatadas diferenças expressivas devidas à inoculação;
2. O número de nódulos da soja aumentou até os 56 DAG e a produção de matéria seca desses nódulos até 85 DAG;
3. Houve cerca de 8% de aumento na ocupação nodular pelas estirpes dos inoculantes, sendo que a SEMIA 5019 (=29W) mostrou-se mais competitiva;
4. A estirpe 587 mostrou-se menos competitiva que a estirpe 5052 (sorogrupo USDA 6), já estabelecida no solo, que passou a predominar no final do ciclo da soja;
5. Apesar do aumento de 8 % na ocorrência das estirpes do inoculante, a inoculação não interferiu significativamente na produção de matéria seca da parte aérea, de raiz e de nódulos, nem na produção de grãos de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, O.; RAMIREZ, C.; MONTERO, R.; MATA, E. Respuesta de La Soya (*Glycine max* Merr.) A La Inoculacion Con Diversas Cepas De *Rhizobium japonicum* En Liberia, Guanacaste. Agronomia Costarricense, San Jose, CR, 11(1): 33-7, 1987.

ALEXANDER, M. Most-Probable-Number method for microbial populations. In: BLACK, C.A. et al, ed. Methods of soil analysis. Wisconsin, Publisher Madison, Wisconsin, 1572p. 1965. Part. 2 (Series Agronomy American Society of Agronomy).

AMARGER, N. Selection of *Rhizobium* Strain of their competitive Ability for Nodulation. Soil Biological Biochemical 13, 481-86, 1981.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1993.

ARRARÁS, E.A.; BOIARDI, J.L.; PASTRANA, C. Amplio Espectro de Nodulation de 2 Cepas Selectas de *Rhizobium japonicum* en 16 Variedades de Soja (*Glycine max* (L.) Merril). In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12., Campinas, 1984. Anais. Campinas, Instituto Agronômico 1986. p.141-51

- ARRIAGADA, F.O.G. Resposta da soja inoculada com *Rhizobium japonicum* à aplicação de N-Nítrico em diferentes fases de seu ciclo. Viçosa, 1989. 46p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).
- CAMPO, R.J.; HENNING, A.A.; NETO FRANÇA, J.B.; PALHANO, J.B.; LANTAMANN, A.F.; SFREDO, G.L.; COSTA, N.P. da. O tratamento de sementes de Soja e a fixação Simbiótica do Nitrogênio. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 3., Londrina, 1984. Anais. Londrina, EMBRAPA-CNPS de Londrina, 1984. p. 888-97.
- CIAFARDINI, G. & BARBIERI, C. Effects of Cover Inoculation of Soybean on Nodulation Fixation, and Yeild. Agronomy Journal, Madison, US. 79, (4): 645-48, 1987.
- CIAFARDINI, G. & LOMBARDO, G.M. Nodulation, Dinitrogen Fixation, and Yield Improvement in Second-Crop Soybean Cover-Inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Agronomy Journal, Madison, US. 83: 622-25, 1991.
- DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; AWONAIKE, K.O. Effect of postemergence, Supplemental Inoculation on Nodulation and Symbiotic Performance of Soybean (*Glycine max* (L.) Merril.) at Three Levels of Soil Nitrogen. Applied and Environmental Microbiology, Berlin, VN., 56 (6): 1793-98, 1990.

DATE, R.A. & DECKER, A.M. Minimal Antigenic Constitution of 28 Strains of *Rhizobium japonicum*. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 11 (1): 1-8, 1965.

ERDMAN, L.W. Legume inoculation: What it is - What it does. Washington, U.S. Dept. Agric., 1959. 16p. (Farmers' Bull. 2003).

FAO. PRODUCTION YEARBOOK, vol.47, 1994.

FREIRE, J.R.J.; KOLLING, I.G.; SILVA, G.M. *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Culture Collection Catalogue. MIRCEN. 6th (1991).

FUHRMANN, J.J. Population Diversity Groupings of soybean Bradyrhizobia. Advances in Agronomy, San Diego, 50, 67-105, 1993.

GALLI, L.V. Avaliação de genótipos de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill e de Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* para a Eficiência Simbiótica. Piracicaba, 1987.137p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GRAHAN, P.H. & TEMPLE, S.R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merrill and *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil, Dordrecht, NL, 82, 315-27,

1984.

GOMES, M.F.M. Efeitos da expansão da produção de soja em duas regiões do Brasil. Viçosa. 1990. 105p (Doutorado, Universidade Federal de Viçosa).

KAMICKER, B.J. & BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin Soybean Farms. Applied on Environmental Microbiology, Berlin, VN., 487-92, Mar.1986.

KANNENBERG, E.L.; PEROTTO, S.; BIANCIOTTO, V.; RATHBUN, E.A. & BREWIN, N.J. Lipopolysaccharide epitope expression of *Rhizobium* bacteroids as revealed by in situ immunolabelling of pea root nodules sections. Journal of Bacteriology, Baltimore. MD., 176(7): 2021-32, 1994.

KASTER, M. & BONATO, E.R. Contribuição das ciências agrárias para o desenvolvimento da pesquisa em soja. Revista da Economia Rural, 18 (3): 415-34, 1980.

KEYSER, H.H. & WEBER, D.F. USDA-Betsville *Rhizobium* culture collection catalogue. PPHI REPORT N^o 16 (1979).

KEYSER, H.H. & LI, F. Potencial for increasing biological nitrogen fixation in soybean. Plant and Soil, Dordrecht, NL, 141: 119-35 1992.

KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; PEREIRA, J.R.; KOLLING, I.G.

Resposta da soja à inoculação com níveis de inóculo e ocorrência serogrupos de *Rhizobium japonicum* em solo com população estabelecida. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12., Campinas, 1984. Anais. Campinas, Instituto Agronômico, 1986. p.358-63.

LASSAGNO, M. & FRIORI, L. Obtenção de Mutantes de *Rhizobium meliloti* Resistentes a Antibióticos. Boletim de Investigacion, Montevideo, 9 (1-12), 1988.

LEMONS, E.G.M. Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise dos padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade de nitrogenase. Jaboticabal, 1994. 108p. (Livre Docência - UNESP, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho).

LOPES. E.S.; DEUBER, R.; FORSTER, R.; GARGANTINI, H.; BULISANI, E.A. Influência dos herbicidas EPTC e Trifluralin e da inoculação das sementes com *Rhizobium phaseoli* na nodulação e produção do feijoeiro (*Phaseoli vulgaris* L.) BRAGANTIA, Campinas., 30: 11. 1971.

LOPES, E. S.; GIARDINI, A.R.; KIIHL, R.A.S.; IGUE, T. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa-Rosa,

Viçosa e IAC-2 de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill).

BRAGANTIA, Campinas., 35: 1-11. 1976.

LOPES, E. S. & GIARDINI, A.R. RIZOBIOLOGIA. Estudos no Estado de São Paulo, In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J.C. ed. A soja no Brasil. 1981; p. 425-36.

LOPES, E. S. & LOMBARDI, M.L.C.O. Fixação de nitrogênio em leguminosas, Casa da Agricultura, São Paulo, v.8: 31-2, jan./fev. 1986.

MACEDO, E.C. & OLIVEIRA, P.A. Efeitos do herbicida Trifluralin na interação simbiótica rhizobium soja (*Glycine max* (L.) Merrill), Cultivar IAC-8. Biológico, São Paulo, 54 (7/12): 39-43, jun./dez. 1988.

MARTENSSON, A.M.; BRUTTI, L.; LJUNGGREN, H. Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. Plant and Soil, Dordrecht, NL, 117, 219-25, 1989.

MARTENSSON, A.M. Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, CA., 36: 136-9, 1990.

- Mc LOUGHLIN, T.J.; ALT, S.G.; GONZALEZ, R.G. & SEVERSON, R.
Effects on Soybean Seed Yield by Members of 123
Serocluster and USDA 110 in the Greenhouse and in Soils
Low in Indigenous *Bradyrhizobium japonicum*. Canadian
Journal Microbiology, Ottawa, CA., 37: 984-8. 1991.
- MEANS, URA M.; HERBERT, W.J. & DATE, R.A. Quick serological
method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in
nodules. Journal of Bacteriology, Baltimore, MD., 87
(2):547-53, 1964.
- MIYASAKA, S. Contribuição para o melhoramento da soja no
Estado de São Paulo. Piracicaba, 1958. 47p. (Doutorado
-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MORAES, R.C.P. Efeito do Metribuzin sobre a Tolerância,
Nodulação, Crescimento, Morfologia e Partição de
Assimilados em Soja (*Glycine max*) Merrill. Viçosa,
1989. 104p. (Mestrado Universidade Federal de Viçosa).
- MULLEN, M.D. & WOLLUM II, A.G. Variation among different
cultures of *Bradyrhizobium japonicum* strains USDA 110
and 122. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, CA., 35:
583-8, 1989.
- NISHI, C.Y.M. ; HUNGRIA, M. Infecção, Competitividade e
Eficiência da Fixação do N₂ em Soja Inoculada com as

Estirpes SEMIA 566, 586, 5079 e 5080. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24; Goiânia, 1993. Resumos. Goiânia, SBCS, 1993. r.3, p.321-2.

NISHI, C.Y.M. & HUNGRIA, M. Eficiência da fixação biológica do N₂ e capacidade competitiva das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 inoculadas em soja (*Glycine max* (L.) Merril). Pesquisa em andamento - EMBRAPA - Londrina no. 15 jul./93, p.3.

OLSEN, P.E. & RICE, W.A. *Bradyrhizobium* Strain Identification and Qualification in Comercial Inoculants by Immunoblot Analysis Applied and Environmental Microbiology, Berlin, 55, 520-522 (1989).

OWIREDO, J.D. & DANSO, S.K.A. Response of Soybean [*Glycine max* (L.) Merril.] to *Bradyrhizobium japonicum* Inoculation in Three Soils In Ghana. Soil Biological Biochemical 20 (3):311-4, 1988.

PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Seleção de Estirpes de *Rhizobium japonicum* e Competitividade por Sítios de Infecção Nodular em Cultivares de Soja (*Glycine max*) (L.) Merrill. Agronomia Sulriograndense, Porto Alegre, 16 (2): 205-19, 1980.

RUMJANEK, N.G.; van BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculants strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii* Applied on Environmental Microbiology, Berlin, VN., 59: 4371-3, 1993.

RUSCHEL, A.P.; BRITO, D.P.P.S.; CARVALHO, L.E. Efeito do Boro, Molibdênio e Zinco, quando aplicados ao Revestimento da semente de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 4: 29-37, 1969.

RUSCHEL, A.P. & REUSZER, H.W. Desenvolvimento da nodulação e fixação Simbiótica de nitrogênio em variedades de soja, em diferentes estádios de Desenvolvimento da planta. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, Brasília, 8 (8): 251-6, 1973.

RUSCHEL, A.P. & FREITAS, J.R. Aumento do Potencial de Fixação Biológica de Nitrogênio em Soja. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12., Campinas, 1984, ANAIS. Campinas, Instituto Agronômico, 1986. p. 568-9.

SALAMANCA, C.R.S.; VARELA, R.G.; BRADLEY, R.S. Selección de Cepas de Rizóbios en Suelos Promisorios para el Cultivo de la Soya (*Glycine max* (L.) Merrill)) en Colombia, Acta Agronomica, Palmira, 39 (1-2): 59-71, 1989.

SANTOS, V. A. F. ; RUMJANEK, N. G. ; NEVES, M. C. P. Produção de grãos de soja: papel da manutenção de nódulos ativos e eficientes no período reprodutivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24, 1993. Resumos, Goiânia: SBCS, 1993. v.3, 323-4.

SMITH, G. B. & WOLLUM II, A. G. Nodulation of *Glycine max* by Six *Bradyrhizobium japonicum* Strains with Different Competitive Abilities. Applied on Environmental Microbiology, Berlin, VN., 55(8): 1957-62, 1989.

SOMASEGARAM, P. & HOBEN, H. J. Methods in legume Rhizobium tecnology. NIFTAL/MIRCEN, 1985. 367p.

STAMMER, E. E. Amostragem de Nódulos para Testes Sorológicos na Identificação de Estirpes de *Rhizobium*. Arquivos Biologia Tecnologia, São Paulo, 1 (16): 20-33, 1973.

TEANEY III, G. B. & FUHRMANN, J. J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxina phenotype. Plant and Soil, Dordrecht, NL, 145: 275-85, 1992.

THIES, J. E. ; SINGLETON, P. W. & BEN BOHLOOL, B. Influence of the size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. Applied on Environmental

Microbiology, Berlin, VN., 57 (1): 19-28, 1991.

TSAI, C.M. & FRASCH, C.E. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 119: 115-9, 1982.

VARELA, R.G. & AGUDELO, O.D. Influência de La Distancia de Siembra sobre La Nodulacion de Cuatro Variedades de Soya. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, Campinas, 12., 1984. Anais. Campinas, Instituto Agrônômico, 1986. p.300-15.

VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A. & PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-mineral. Revista brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 15: 267-72, 1991.

VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeito de tipos e Níveis de Inoculantes na Soja Cultivada em um Solo de Cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 15(3): 343-7, jul. 1980.

VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeitos da Inoculação e Deficiência Hídrica no Desenvolvimento da Soja em um Solo de Cerrado. Revista Brasileira de Ciência do Solo,

Campinas, 4: 17-21, 1980.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R., PERES, J.R.R.

Inoculation of soybean in cerrado soils with established populations of *Bradyrhizobium japonicum*. Revista Microbiologia, São Paulo, 25(4): 245-50, 1994.

VEJSADOVÁ, H.; SIBLÍKOVÁ, D.; HRSELOVÁ, H. & VANČURA, V.

Effect of the VAM fungus *Glomus* sp. on the growth and yield of soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Plant and Soil, Dordrecht, NL, 140: 121-125, 1992.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. IBP, Handb. n^o 15, 1970.

VIDOR, C. Studies of Saprophytic Competence in Strains of *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan. Ohio, 1977. (Doctor of Philosophy - Ohio State University).

WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field Studies. Agronomy Journal, Madison, 66: 233-6, Mar./Apr., 1974.

WEBER, D.F.; CALDWELL, B.E.; SLOGER, C. & VEST, H.G. Some USDA studies on the soybean - *Rhizobium*, symbiosis.

Plant and Soil, Dordrecht, NL,. Special Volume, 293-304, 1971.

WERNWE, J.C. Fatores do Solo Limitantes da Fixação Biológicas do Nitrogênio. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12., 1984. ANAIS. Campinas, Instituto Agrônômico, 1986.

ZDOR, R.E. & PUEPPKE, S.G. Competition for Nodulation of Soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138 in Soil Containing indigenous Rhizobia. Soil Biological Biochemical, 22 (5): 607-13, 1990.

ZDOR, R.E. & PUEPPKE, S.G. Early Infection and Competition for Nodulation of Soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138⁺. Applied on Environmental Microbiology, Berlin, VN. 54 (8): 1996-2002, 1988.

Apêndice 1 - MEIOS DE CULTURA

MEIO YM (VINCENT, 1970)	Composição do meio 0,50g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 0,20g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,10g de NaCl; 0,50g de extrato de levedura; 0,01g de $FeCl_3$ q.s.p. 1000ml de H_2O ; pH 6,8
MEIO YMA	ao meio YM adiciona-se 18g de agar para 1000ml.
MEIO YMA-Vermelho Congo	ao meio YMA adiciona-se 0,0025% do corante vermelho congo.
MEIO YMB	ao meio YM adiciona-se 5ml da solução (1g de azul de bromotimol em 200ml de álcool 95%.

APÊNDICE 2 - Tampões, Soluções e Géis

TAMPÃO DA AMOSTRA DE LIPOPOLISSACARÍDIO

Tris-HCl (0,1M pH 7,2)-----	1,21g
MgCl 5mM-----	0,101g
Glicerol 15%-----	15,0g
Mercaptoetanol 0,1%-----	100 μ l
H_2O destilada-----	q.s.p. 100ml

SOLUÇÃO DE CLORONAFTOL

4 - cloro - 1 - naftol-----0,3g

Etanol absoluto-----10ml

Esta solução deve ser mantida a -20°C

TAMPÃO FOSFATO (PBS)

NaCl-----8g

KCl-----0,2g

 Na_2HPO_4 -----1,44g KH_2PO_4 -----0,24g H_2O destilada -----q. s. p. 1000ml

pH = 7,6

GEL DE SEPARAÇÃO (13% SDS PAGE)

Tris-HCl 2,25M pH 8,8 -----4,35ml

Acrilamida-Bis (30% ; 0,8%)-----11,31ml

 H_2O deionizada-----9,45ml

SDS 4%-----0,65ml

TEMED-----30 μl Persulfato de amônio a 10%-----300 μl

GEL DE EMPILHAMENTO (5%)

Tris-HCl 0,5M pH 6,8 -----2,0ml

Acrilamida-Bis -----1,33ml

 H_2O deionizada-----4,42ml

SDS 4%-----0,20ml

TEMED-----20 μl Persulfato de amônio a 10%-----80 μl

REAGENTE DE COR

NaOH 0,1N -----28ml

 NH_4OH -----2mlNitrato de prata 20% -----1g/5ml de H_2O H_2O deionizada -----115ml

(Obs.: O reagente de cor deve ser preparado e usado imediatamente)

SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO (REVELAÇÃO)

Formaldeído -----500 μ l

Ácido cítrico -----50mg

 H_2O deionizada -----200ml

APÊNDICE 3 - Tabelas

3.1. Produção de matéria seca da parte aérea da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragem, em experimento de inoculação, conduzido no município de São Joaquim da Barra, SP. Médias de 8 repetições.

Tratamento (1)	DAG (2)					
	10	28	42	56	70	85
	-----g/pl.-----					
A	0,32 ⁽³⁾	2,89	6,83	16,49	25,54	27,39
B	0,34	3,69	8,92	19,13	22,29	29,34
C	0,32	2,60	9,31	13,76	24,53	28,19
D	0,32	3,30	5,50	13,01	24,93	27,88

C. V. = 42,71% (inoculação); 18,22% (amostragem)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;

C = 10^7 rizóbios/g; D = 10^{10} rizóbios/g.

(2) DAG = dias após a germinação

(3) Não há diferenças significativas entre tratamentos
(p=0,05)

3.2. Produção de matéria seca de raiz da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragem, em experimento de inoculação, conduzido no município de São Joaquim da Barra, SP Médias de 8 repetições.

Tratamento (1)	DAG (2)					
	10	28	42	56	70	85
	-----g/pl.-----					
A	0,06 ⁽³⁾	0,45	1,05	1,74	1,84	1,52
B	0,07	0,57	1,19	1,89	1,83	1,57
C	0,08	0,44	1,28	1,38	2,01	1,50
D	0,05	0,45	0,89	1,35	1,84	1,81

C. V. = 33,55% (inoculação); 14,14% (amostragem)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;
C = 10^7 rizóbios/g; D = 10^{10} rizóbios/g.

(2) DAG = dias após a germinação

(3) Não há diferenças significativas entre tratamentos (p=0,05).

3.3. Produção de matéria seca de nódulos da variedade de soja IAS-5, observada em seis épocas de amostragem, em experimento de inoculação, conduzido no município de São Joaquim da Barra, SP Médias de 8 repetições.

Tratamento (1)	DAG (2)					
	10	28	42	56	70	85
-----mg/pl. -----						
A	6,15 ⁽³⁾	60,30	141,25	241,25	256,25	296,87
B	1,32	31,23	96,25	216,87	243,75	178,75
C	10,06	46,43	162,50	243,75	203,75	298,12
D	4,02	76,20	122,50	231,87	283,12	209,37

C. V. = 51,32% (inoculação); 22,87% (amostragem)

(1) A = Sem inoculação e sem N; B = Sem inoculação e com N;

C = 10^7 rizóbios/g; D = 10^{10} rizóbios/g.

(2) DAG = dias após a germinação

(3) Não há diferenças significativas entre tratamentos (p=0,05).