

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

SIMBIOSE E VARIABILIDADE DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*
ASSOCIADAS À CULTURA DA SOJA EM DIFERENTES
MANEJOS DO SOLO

Mariel Josué Bizarro
(Tese de Doutorado)

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

SIMBIOSE E VARIABILIDADE DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*
ASSOCIADAS À CULTURA DA SOJA EM DIFERENTES
MANEJOS DO SOLO

MARIEL JOSUÉ BIZARRO
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)
Mestre em Agronomia (UFRGS)

Tese apresentada como um dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Maio de 2008

Ao meu avô Seno Edmundo Helfer (*in memoriam*),
pelo exemplo de vida e incentivo em estudar
sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa e colega Veridiana pelo amor, apoio e companheirismo.

À minha mãe e irmãs pelo incentivo.

Ao meu pai pelo convívio.

Ao professor Pedro Alberto Selbach, pelo apoio incondicional, orientação, confiança e amizade.

Aos professores e amigos Enilson L. Saccol de Sá, Flávio A. O. Camargo pelos ensinamentos e sugestões.

Aos pesquisadores e amigos Luciano K. Vargas e Adriana Giongo pelas inúmeras horas de dedicação e pelo amistoso convívio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelas oportunidades de realização do Doutorado.

Aos colegas, funcionários e amigos pela amizade e acolhida.

VARIABILIDADE DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* ASSOCIADAS À CULTURA DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES MANEJOS DO SOLO¹

Autor: Mariel Josué Bizarro

Orientador: Prof. Pedro Alberto Selbach

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio é capaz de suprir toda demanda de nitrogênio da cultura da soja. Entretanto, diversos fatores podem impedir a expressão da máxima eficiência deste processo. Tanto a semeadura quanto o preparo do solo geram mobilização, que favorece a mineralização da matéria orgânica. Este nitrogênio mineralizado pode ser suficiente para limitar a fixação biológica, mas insuficiente para suprir toda necessidade da cultura. Assim os objetivos deste trabalho foram: (Estudo I) avaliar a resposta à inoculação da soja a campo sob diferentes sistemas de manejo; (Estudo II) verificar a existência de interações entre estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja, que sejam mais tolerantes a presença do nitrogênio mineral; (Estudo III) avaliar a variabilidade genética de estirpes de *Bradyrhizobium* após introdução no solo; e identificar as estirpes presentes nos nódulos coletados no campo. (Estudo I) Avaliou-se o número e massa de nódulos, além da massa da parte aérea e o teor de nitrogênio de plantas de soja coletadas e o teor de nitrogênio mineral do solo em experimento de campo. (Estudo II) A verificação de interações entre *Bradyrhizobium* e cultivares de soja resistentes ao nitrogênio mineral foi realizada em casa de vegetação, utilizando-se vasos do tipo Leonard com solução nutritiva. Adicionaram-se concentrações de 0, 8, 16 e 24mM de nitrogênio, quatro cultivares de soja e quatro estirpes de *Bradyrhizobium*. (Estudo III) A variabilidade genética e a caracterização sorológica dos rizóbios introduzidos no solo foram avaliadas em isolados obtidos de nódulos de plantas de soja sob diferentes sistemas de manejo. (Estudo I) Houve resposta à inoculação em termos de aumento da nodulação, massa da parte aérea e nitrogênio total no tecido de plantas de soja no experimento de campo. (Estudo II) Encontrou-se variação na magnitude da tolerância da FBN, ao aumento do teor de nitrogênio mineral, dependendo da cultivar de soja, sendo a BRS-Torena a mais tolerante, e da estirpe de *Bradyrhizobium*, sendo as SEMIA 587 e SEMIA 5019 mais resistentes. (Estudo III) A variabilidade genética foi maior no plantio direto do que no plantio convencional, maior na adubação mineral, do que na adubação orgânica, e maior no cultivo de trigo ou aveia do que na aveia e ervilhaca. Dentre as estirpes utilizadas a SEMIA 587 e SEMIA 5019, apresentaram uma ocupação nodular de 92% caracterizando-as como mais competitivas.

¹ Tese de Doutorado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97p.), maio, 2008.

VARIABILITY OF *Bradyrhizobium* STRAINS ASSOCIATED TO SOYBEAN UNDER TO DIFFERENT SOIL MANAGEMENT²

Author: Mariel Josué Bizarro

Adviser: Prof. Pedro Alberto Selbach

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation can supply all needed nitrogen to soybean. However, several factors can affect the expression of the maximum efficiency of this process. Both sown and soil mobilization can increase soil organic matter mineralization and it can release nitrogen to soil solution, which can be enough to limit the biological fixation, but insufficient to supply all the needs of the soybean N. The aimed of this research was: (Study I) to evaluate the soybean response to inoculation under different management systems; (Study II) to verify the existence of interactions among *Bradyrhizobium* strains and soybean genotypes which are more tolerant to the presence of mineral nitrogen; (Study III) to evaluate the genetic variability of *Bradyrhizobium* strains after their introduction into the soil and to identify the strains present in soybean nodules collected in the field. (Study I) The nodules were counted and the dry mass measured. They also was measured the nitrogen content, the dry mass of soybean plant and the soil mineral nitrogen in field experiment. (Study II) The interactions among *Bradyrhizobium* and resistant to mineral nitrogen soybean genotypes were carried out in Leonard jars with nutritious solution. In this experiment it was used four nitrogen doses (0, 8, 16 and 24mM), four soybean genotypes and four *Bradyrhizobium* strains. (Study III) The genetic variability and nodules occupancy of the rhizobia introduced in the soil were evaluated in isolated microorganisms obtained from soybean nodules collected in the field. (Study I) The inoculation positively affected the number of nodules and its mass, the above ground dry mass and nitrogen content. (Study II) The tolerance of BNF to increasing of mineral nitrogen was variable and it was dependent of soybean genotype (BRS-Torena the most tolerant) and of *Bradyrhizobium* strain (SEMIA 587 and SEMIA 5019 more resistants). (Study III) The genetic variability was larger in the no tillage than in the conventional tillage, larger in the mineral fertilization than in the organic. Similar fact was observed in the wheat or oat cultivation compared with oat and hairy vetch. The SEMIA 587 and SEMIA 5019 presented a nodule occupation of 92% characterizing them as more competitive *Bradyrhizobium* strains.

² Doctorate Thesis in Soil Science, Agronomy Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (97p.) - may, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1.1 Simbiose Rizóbio-Leguminosa.....	05
2.1.1.1 Características gerais da espécie <i>Glycine max</i>	05
2.1.1.2 Bactérias diazotróficas do gênero <i>Bradyrhizobium</i> - Características gerais	07
2.1.1.3 Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas	09
2.1.2 Fatores que Interferem na Nodulação e na Fixação do N ₂	10
2.1.2.1 Elementos edafo-climáticos	10
2.1.2.2 Nitrogênio mineral	13
2.1.2.3 Preparo do solo.....	13
2.1.2.4 Sobrevivência e competitividade nodular.....	14
2.1.2.5 Interação cultivar de soja- <i>Bradyrhizobium</i>	17
2.1.3 Variabilidade Genética e Caracterização Sorológica de <i>Bradyrhizobium</i>	18
2.1.3.1 Mecanismos de Variabilidade Genética em Procariotos.....	18
2.1.3.2 Técnicas para Estudo da Variabilidade Genética	19
2.1.3.3 Identificação de Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> por Soroaglutinação	20
3. CAPÍTULO I - RESPOSTA À INOCULAÇÃO DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO	22
3.1 INTRODUÇÃO	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.3.1 Resposta à inoculação.....	29
3.3.2 Número e massa de nódulos	29
3.3.3 Massa da parte aérea e nitrogênio total do tecido	30
3.3.4 Nitrogênio mineral do solo	37

3.3.5 Efeito do teor de nitrogênio mineral do solo na nodulação	40
3.4. CONCLUSÕES	41
4. CAPÍTULO II - RESISTÊNCIA AO NITROGÊNIO MINERAL NA INTERAÇÃO SOJA MICROSSIMBIONTE	42
4.1 INTRODUÇÃO	43
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.4 CONCLUSÕES	54
5. CAPÍTULOS III - VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE ESTIRPES DE <i>Bradyrhizobium</i> RECUPERADAS DE SOLO SOB DIFERENTES MANEJOS	55
5.1 INTRODUÇÃO	56
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.2.1 Local e amostragem	58
5.2.2 Isolamento dos rizóbios	58
5.2.3 Extração de DNA genômico	59
5.2.4 Perfis de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores	59
5.2.5 Géis para análise de fragmentos amplificados por PCR..	60
5.2.6 Análise de relacionamento genético	60
5.2.7 Caracterização sorológica	61
5.2.7.1 Produção de anti-soros	61
5.2.7.2 Tipificação dos <i>Bradyrhizobium</i> por soroaglutinação	61
5.2.8 Identificação da espécie de <i>Bradyrhizobium</i> por amplificação de seqüências do gene 16S RNAr	62
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.4 CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. CONCLUSÕES GERAIS	87
8. APÊNDICES	88

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Fatores que interferem na fixação biológica do nitrogênio e possíveis recomendações (Montañes, 2000)	11
Fases fenológicas da cultura da soja e respectivas simbologias.....	28
Efeito simples dos fatores adubação, preparo e inoculação para as variáveis número de nódulos, massa de nódulos, massa da parte aérea e nitrogênio total no tecido no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja. Ano agrícola de 2005/2006	32
Número de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 7 repetições. Ano agrícola de 2005/2006	33
Massa seca de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 7 repetições. Ano agrícola de 2005/2006	34
Massa seca da parte aérea no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 3 repetições. Ano agrícola de 2005/2006	35
Nitrogênio total no tecido no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 3 repetições. Ano agrícola de 2005/2006	36
Cultivares de soja com respectivos ciclos de cultura, ciclos vegetativos, origens e ano de lançamento.....	46
Valores do teste F para número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea avaliado no início do florescimento das plantas de soja.....	47
Efeito de diferentes cultivares de soja e estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> a doses de nitrogênio sobre número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea. Experimento conduzido em vasos “Leonard” com solução nutritiva e três repetições	49
Equações de regressão ajustadas aos dados de número de nódulos e massa de nódulos, em função de diferentes doses de nitrogênio e cultivares de soja inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	53
Identificação e origem dos isolados recuperados de solo sob diferentes tipos de manejo	59
Diferenciação de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i> utilizando seqüências do gene RNAr 16S amplificadas com trincas de oligonucleotídeos específicos para cada espécie	68

RELAÇÃO DAS FIGURAS

	Página
Esquema da área experimental	27
Teores de nitrogênio mineral do solo sob cultivo de soja, avaliados nos estádios: V2, V5, R1, R8 e 20 dias após colheita referentes ao ano agrícola de 2005/2006	39
Efeito do N mineral do solo sobre a massa seca de nódulos. Nódulos avaliados nos estádios V5 e R1 e nitrogênio mineral no estádio R1. Dados do ano agrícola de 2005/2006	40
Relação entre número de nódulos e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e cultivares de soja.....	50
Relação entre massa de nódulos e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e cultivares de soja.....	51
Relação entre massa seca da parte aérea e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e cultivares de soja.....	52
Dendrograma da variabilidade genética de <i>Bradyrhizobium</i> recuperados de solo sob diferentes sistemas de manejo, utilizando análise de clusteres do produto do PCR obtido por ampliações do DNA com oligonucleotídeos BOX A 1R, ERIC1R e ERIC2	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os teores de nitrogênio nos solos brasileiros, de um modo geral, situam-se na faixa de 0,05 a 0,30%, apresentando quantidades insuficientes para a produção das diferentes culturas agrícolas. Conseqüentemente, este macronutriente é o mais limitante à produtividade das culturas e pode representar cerca de 70% dos custos de adubação nos países em desenvolvimento. Com a intensificação da agricultura, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, as exigências nutricionais por nitrogênio, bem como sua remoção, sejam por plantas ou perdas por lixiviação e ou erosão, são ampliadas. A reposição do nitrogênio do solo ocorre pela adição de fertilizantes nitrogenados ou pela fixação biológica, realizada por microrganismos de vida livre ou simbióticos. Faz-se necessária a busca de fontes alternativas para a adubação nitrogenada, visando o aumento da produtividade dos cultivos de forma ecologicamente aceitável e economicamente sustentável.

A simbiose entre bactérias diazotróficas e leguminosas é o exemplo mais conhecido de interação entre planta e fixadores de nitrogênio. Cabe salientar que nesta área os trabalhos desenvolvidos pelo Departamento de Solos-UFRGS e pela FEPAGRO-RS foram pioneiros no país, com substancial contribuição para o setor. A fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja permite que esta cultura seja auto-suficiente em relação a este elemento. A inoculação anual é uma prática recomendada na cultura da soja para garantir a formação de nódulos com estirpes altamente eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico. Entretanto, casos de insucesso relacionado à inoculação são descritos. O insucesso pode estar relacionado ao fato do cultivo da soja estar sujeito a diversos sistemas de manejo, o que predispõe a uma diversidade de fatores que interferem no processo de fixação biológica do nitrogênio, tais como preparo do solo e adubação orgânica ou mineral. Outro importante fator

de interferência neste sistema é o nitrogênio mineral do solo, sendo conhecido o efeito inibitório do nitrogênio mineral sobre a fixação biológica. Apesar disto, não há referências quanto à magnitude deste efeito sobre as estirpes recomendadas e cultivares de soja. Além disso, é necessário estudar a sobrevivência e competitividade das estirpes utilizadas no campo, além da variabilidade genética destas, associadas a diferentes manejos do solo.

Sistemas conservacionistas de preparo do solo que utilizam rotações de culturas, incluindo plantas leguminosas, permitem aporte de nitrogênio via fixação biológica. Por outro lado, a utilização de sistema conservacionista, como o plantio direto (PD), com uso de culturas de alto aporte de carbono vem aumentando no solo os teores de matéria orgânica e, conseqüentemente, de nitrogênio orgânico. A mineralização desta matéria orgânica pode ser um fator limitante à fixação biológica do nitrogênio (FBN) sendo suficiente para impedir a nodulação, mas insuficiente para o suprimento total da cultura, conseqüentemente determinando menores rendimentos de grãos.

O trabalho tem por hipóteses que:

1. 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 da planta.
2. O efeito inibitório do nitrogênio mineral sobre a FBN depende da estirpe e da cultivar de soja em interação, sendo possível selecionar interações mais tolerantes ao nitrogênio mineral do solo.
3. A ocupação dos nódulos de soja é predominantemente pertencente a uma estirpe, a mais competitiva.
4. A variabilidade genética de estirpes de *Bradyrhizobium* introduzidas no solo está relacionada ao sistema de manejo.

Tendo em vista a diversidade de fatores que interferem na fixação simbiótica do nitrogênio na soja, o presente trabalho teve por objetivos: **a)** avaliar o efeito de diferentes manejos do solo sobre o teor de nitrogênio mineral do solo, sobre a nodulação, a produção de matéria seca e o nitrogênio total do tecido da parte aérea da planta; **b)** verificar a existência de interações entre diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e diferentes variedades de soja, que

sejam mais tolerantes a presença de nitrogênio mineral do solo sem que haja danos a FBN; **c)** avaliar a variabilidade genética das estirpes recomendadas para a cultura da soja, no solo submetido a diferentes sistemas de manejo após seis anos de inoculação; **d)** avaliar o efeito de diferentes sistemas de cultivo sobre a sobrevivência das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 no solo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA

2.1.1.1 Características gerais 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 família *Fabaceae*, adotando a proposta sugerida por Delorit & Gunn (1986), que subdivide a família *Leguminosae*, criando a subfamília *Fabaceae* na qual a soja estaria incluída.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrier] 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 oblongas 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).

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 e 200 dias para as variedades tardias (Vargas & Hungria, 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 o estabelecimento da simbiose rizóbio/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 na floração e na 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 a prática da utilização de adubos nitrogenados uma prática que gera impactos ambientais e elevados custos de produção, a utilização da fixação biológica do nitrogênio é uma excelente alternativa no caso da soja (Embrapa, 2002).

2.1.1.2 Bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* - Características gerais

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* apresentam 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, 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 freqüência 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 e seu tamanho não excede a um milímetro de diâmetro para um período de incubação de cinco a sete dias. As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas tropicais e temperadas (Holt et al., 1994; Somasegaran & Hoben, 1994; Sahgal & Johri, 2003; Willems, 2006).

O grupo de bactérias que fixam nitrogênio atmosférico no interior de nódulos em raízes de leguminosas foi inicialmente 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). A partir do reconhecimento dos grupos de inoculação cruzada, as bactérias responsáveis pela nodulação da soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum*. As limitações do método da infecção em plantas e as diferenças existentes nas espécies pertencentes a este gênero mostraram que o gênero *Rhizobium* consistia de um grupo de bactérias bastante diverso. Este fato determinou 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 Löhnis & Hansen (1921).

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 demonstraram a existência de grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* (Hollis et al., 1981; Stanley et al., 1985; Minamisawa, 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* recomendadas para inoculantes no Brasil (SEMIA 5019 e a SEMIA 587), 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 "naturalizadas" diferenciavam-se, embora não tenha sido feita nenhuma correlação com a divisão em genótipos ou espécies. Análises posteriores utilizando técnicas de PCR (Sato et al., 1999) e características fenotípicas (Lemos, 1994; Boddey & Hungria, 1995) constataram a existência de dois agrupamentos envolvendo as quatro estirpes "naturalizadas", 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).

2.1.1.3 Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas

O nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes à produção de grãos nas regiões de clima tropical, e sua fixação biológica é importante para produção vegetal. No Brasil a FBN em soja é um dos exemplos de maior sucesso, uma vez que a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* possibilita uma economia anual aproximada de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados (Hungria et al., 2005; Fagan et al., 2007).

O processo de fixação biológica quebra a molécula de N_2 e transforma em NH_4 , ocorrendo grande gasto energético por parte da planta (Burriss, 1999; Taíz & Zieger, 2004). O complexo enzimático capaz de realizar a FBN é denominado de Nitrogenase. Este complexo é formado por duas proteínas, um componente maior ou Mo/Fe-proteína, constituído de um tetrâmero de FeMoS, e o componente menor ou Fe-proteína. Durante a fixação do nitrogênio, a Fe-proteína é reduzida primeiro e transfere elétrons para MoFe-proteína, com consumo de ATP. A Mo/Fe-proteína recebe os elétrons que são direcionados para o N_2 localizado no sítio ativo, efetuando a redução do nitrogênio atmosférico até amônia. Por sua vez, as enzimas glutamina sintetase e a glutamato sintase convertem o NH_4^+ em aminoácidos (Burriss, 1999; Taíz & Zieger, 2004).

Para que se estabeleça a interação entre bactéria e planta hospedeira são necessárias diversas etapas. Inicia com sinalizações moleculares entre o hospedeiro e a bactéria no solo, quando flavonóides são exudados pelas raízes da planta que induzem, nos rizóbios, a expressão dos genes *nod* (López-García et al., 2002; Ausmees et al., 2004). A expressão dos genes *nod* origina enzimas de biossíntese e liberação de lipo-quitto-oligossacarídeos que são secretados (também conhecidos como fatores Nod) os quais são essenciais no processo de infecção (Gresshoff, 2003; Ausmees et al., 2004; Kalita et al., 2006). Polissacarídeos de superfície e/ou proteínas secretadas pelas bactérias também são requeridos na nodulação e interferem na especificidade hospedeira (Ausmees et al., 2004; Kalita et al., 2006).

2.1.2 FATORES QUE INTERFEREM NA NODULAÇÃO E NA FIXAÇÃO DO N₂

Considerando-se o sistema solo – planta – bactéria, vários fatores podem interferir na nodulação e na fixação do N₂. Os efeitos e recomendações para alguns fatores são apresentados na Tabela 1.

2.1.2.1 Elementos edafo-climáticos

Dentre os principais fatores que restringem a resposta da soja à inoculação, destacam-se a acidez do solo e fatores nutricionais relacionados, competição por sítios de nodulação entre as estirpes presentes no inoculante e as já estabelecidas no solo e grande mortalidade de células aderidas à semente durante a semeadura em períodos de alta temperatura e baixa umidade do solo (Freire & Vidor, 1971; Munns, 1977; Keyser & Munns, 1979; Vidor, 1981; Morote et al., 1990; Hungria & Vargas, 2000).

Solos ácidos e com baixa fertilidade são comuns nas áreas de produção e, frequentemente, apresentam concentrações tóxicas de alumínio e, em alguns casos, de manganês (Lal, 1993). Tais condições de solos ácidos podem determinar problemas para a planta, bactéria e simbiose (Giller & Wilson, 1993; Kahindi et al., 1997; Zahran, 1999). Há variação entre espécies e entre estirpes quanto a tolerância à acidez (Lowendorff, 1981; Vargas & Graham, 1988; Brockwell et al., 1995; Hungria et al., 1997; Hungria & Vargas, 2000). Embora o pH ideal para o crescimento varie entre 6,0 e 7,0 (Jordan, 1984; Hungria & Vargas, 2000), alguns poucos rizóbios apresentam bom desenvolvimento em pH abaixo de 5,0 (Graham et al., 1994; Hungria & Vargas, 2000). Exceções incluem estirpes de *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium* sp. Particularmente *Sinorhizobium meliloti* é descrito como altamente sensível a acidez (Brockwell et al., 1995). Entretanto, variações na tolerância a pH ácido foram descritas para estas espécies (Graham et al., 1994; Hungria & Vargas, 2000).

A temperatura é outro importante fator que interfere na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Temperatura de solo situada em 25°C é apontada como

adequada para boa nodulação e fixação do nitrogênio em leguminosas tropicais (Norris & Date, 1976; Hungria & Vargas, 2000).

TABELA 1. Fatores que interferem na fixação biológica do nitrogênio e possíveis recomendações (Montañes, 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 rizóbio 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 desnitrificação 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 Montañes et al. (1995); ⁴ Hungria & Franco (1993); ⁵ Roughley (1980); ⁶ Hardarson (1991); ⁷ Boote et al. (1978); ⁸ Poole et al. (1983); ⁹ Ramos et al. (1993); ¹⁰ FAO (1984); ¹¹ van Kessel & Hartley (2000)

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 II, 1981). 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.

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

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 à interrupção irreversível da fixação do N₂ (Sprent, 1976; Vincent, 1980; Walker & Miller Jr., 1986; Venkateswarlu, 1989; Stamford, 1990; Guerin, 1991; Hungria & Vargas, 2000).

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 & Wood, 1988).

Câmara (1998) afirma que o pH do solo deve estar em torno da neutralidade, no qual o desempenho da FBN é melhor. Solos ácidos podem ser corrigidos por meio de calagem bem dimensionada. Além de corrigir a acidez do solo, a calagem 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.

2.1.2.2 Nitrogênio mineral

De acordo com vários trabalhos sobre o assunto, as formas de nitrogênio mineral do solo influenciam negativamente a FBN e mostram efeito sobre diversos aspectos da simbiose leguminosa/rizóbio (Streeter, 1988; Chalk, 2000; Sinclair et al., 2001; Serraj & Sinclair, 2003). Altas concentrações de NH_4^+ ($\geq 1,0$ mM) têm efeito negativo sobre número e peso de nódulos e atividade da nitrogenase em várias espécies de leguminosas (Dart & Wildon, 1970; Guo, 1992). Além disto, a repressão da indução do gene regulatório *nodD* e genes *nodABC* são dependentes da concentração de amônio em *B. japonicum* (Wang & Stacey, 1990). Exudação de flavonóides responsáveis pela sinalização (Cho & Harper, 1991; Wojtaszek, 1993) e pela infecção das bactérias nas raízes (Dazzo & Brill, 1978) também são afetados por NH_4^+ . Entretanto existem trabalhos abordando tanto efeito positivo quanto negativo, do NH_4^+ sobre a nodulação em simbiose com leguminosas (Dart & Wildon, 1970; Svenning, 1996).

Segundo Gulden & Vessey (1997) há poucos trabalhos reportando o efeito do NH_4^+ na nodulação e fixação do N_2 na soja 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, 1985). 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 à plantas que foram constantemente expostas a 0,5mM NO_3^- (Imsande, 1986).

2.1.2.3 Preparo do solo

A intensa mobilização do solo, causada pela aração e gradagens no plantio convencional, leva à redução dos teores de matéria orgânica e aumenta os riscos de erosão, especialmente nos trópicos. A diminuição do preparo do solo (plantio direto) associada à cobertura com palha aumenta a estabilidade e estrutura dos agregados, reduz os riscos de erosão hídrica e a amplitude térmica e a umidade do solo e, com tempo, aumenta o teor de matéria orgânica (Blevins, 1977; Kember & Derpsch, 1981; Pavan, 1985; van Kessel & Hartley, 2000). Diversos estudos têm indicado que o sistema plantio direto (PD) aumenta a biomassa do solo e a riqueza de espécies (Powlson & Jenkinson, 1981; Staley, 1988; Alvarez, 1995).

Estudos têm demonstrado que o sistema de manejo e preparo do solo PD associado à rotação de culturas favorece a população de rizóbios, a nodulação, a fixação do N₂ e a produção de grãos (Voss & Sidiras, 1985; Hungria & Stacey, 1997; Hungria et al., 1997). Segundo van Kessel (2000), no sistema de preparo plantio direto ocorre a redução do nitrogênio disponível e o aumento da umidade do solo, o que determinam um aumento do potencial da fixação biológica do nitrogênio.

2.1.2.4 Sobrevivência e competitividade nodular

A competitividade nodular é definida como a habilidade de uma ou mais estirpes de rizóbio em 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 no solo, influenciando indiretamente as interações competitivas (Sadowsky, 2000). Hoje também são conhecidos diversos mecanismos de “Quorum Sensing” utilizados pelas espécies de rizóbio na infecção da planta hospedeira, mecanismos esses responsáveis por ativação de genes importantes no processo (González & Marketon, 2003).

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. 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. 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 (Vidor et al., 1979).

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 (McDermott & 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 (Vesper & 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), 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), no qual plantas de trevo transgênicas para o gene lecitina, puderam nodular com *R. leguminosarum* bv *viciae*, espécie de rizóbio que normalmente não nodula trevo. Outro exemplo do envolvimento de lecitinas no processo de adesão se refere à 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, tem origem bacteriana e não vegetal, como se pensava em princípio (Ho et al., 1990). Foi possível observar que uma lecitina constituída de sacarídeos de D-galactose e lactose, denominada de Bj38, foi sintetizada apenas pelo microssimbionte (Ho et al., 1990).

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 (Liu et al., 1989). De acordo com Sadowsky (2000) alterações ou deleção 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 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 Aantoni et al., 1981).

Genes que codificam a produção de fatores antibióticos têm 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 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* têm demonstrado aumentar 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 *R. leguminosarum* bv *trifolii* produtora de bacteriolisina, quando co-inoculada com estirpes sensíveis à esta toxina, resultou em maior 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 rixobiotoxina, por *B. elkanii*, é apontada como um importante mecanismo de sobrevivência e competitividade, estando associada ao aumento da nodulação e ocupação nodular desta espécie (Duodu et al., 1999; Yuhashi et al., 2000)

A avaliação da capacidade de ocupação dos nódulos pode fornecer subsídios em relação à sobrevivência, estabelecimento e competitividade de estirpes já introduzidas (Simon et al., 1996; Martins et al., 2003).

2.1.2.5 Interação Cultivar de soja-*Bradyrhizobium*

Diferenças quanto à eficiência na FBN na interação *Bradyrhizobium* e genótipos de soja foram relatados por Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000). Genes de rizóbios envolvidos na nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) e no processo de FBN (*nif* e *fix*) são bem conhecidos (Stougaard, 2000), no entanto, se conhece pouco sobre os genes das leguminosas hospedeiras relacionados à simbiose. Estudos descrevem mutantes simbióticos tolerantes ao nitrato (*nts*) (Gremaud & Harper, 1989; Akao & Kouchi, 1992).

A atividade da enzima hidrogenase é dependente do genótipo da planta hospedeira, que tem sido identificada em experimentos feitos com diferentes espécies de leguminosas infectadas com a mesma estirpe de rizóbio. Por uma razão ainda não conhecida, o fenótipo Hup⁺ é reprimido de acordo com o hospedeiro. Sendo assim, um terceiro fenótipo em termos de expressão da atividade da hidrogenase tem sido estabelecido: Hup^{hr} (hydrogen uptake host-regulated) (van Berkum, 1990). Rodrigues (1992) chama a atenção para os resultados que indicam a influência dos hospedeiros na expressão da enzima hidrogenase, porque isto poderia levar a conclusões errôneas sobre a caracterização da estirpe quanto ao gene *hup*, e sugere que a enzima hidrogenase provavelmente apresenta funções diferentes, de acordo com a espécie estudada, e os benefícios de sua atividade seriam variáveis conforme o macrossimbionte.

2.1.3 VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE *Bradyrhizobium*

2.1.3.1 Mecanismos de Variabilidade Genética em Procariontos

Os genes podem atuar como geradores de variação ou moduladores da frequência de variações genéticas. As variações genéticas ocorrem, em geral, independentemente dos requerimentos relacionados às condições ambientais em que os organismos vivem (Arber, 2000).

Mecanismos biológicos que atuam no processo de variabilidade genética também podem ser alvos de alterações (Weber, 1996). Com base em conhecimentos de genética microbiana, é possível destacar três estratégias de geração de variação genética em bactérias: i) pequenas mudanças na seqüência de nucleotídeos do genoma; ii) rearranjos intragenômicos de segmentos de seqüência genômicas e iii) aquisição de seqüência de DNA de outros organismos (Arber, 2000).

Existem três mecanismos de transferência de genes em bactérias: i) transdução (é a transferência de DNA de uma célula bacteriana viva para outra através de bacteriófagos); ii) transformação (envolve absorção e incorporação de DNA ambiental) e iii) conjugação (processo de recombinação no qual duas bactérias utilizam mecanismos de transferência de DNA, ocorre na maioria dos gêneros de bactérias) (Dale, 1994).

Genomas bacterianos estão em constante fluxo gênico, sendo que qualquer segmento de DNA em uma população bacteriana pode ser horizontalmente transferido (Arber, 2000). No entanto, apenas uma pequena fração de DNA adquirido será mantida na célula receptora, pois muitos mecanismos limitam as aquisições horizontais de genes. Dentre esses mecanismos, encontram-se modulações fisiológicas, ambientais e genéticas (Solomon & Grossman, 1996; Arber, 2000).

A transferência horizontal é uma importante ferramenta de adaptação de procariontos a um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto gênico já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade destes organismos (Lawrence, 2002). As ilhas genômicas (mesmos genes que apresentam a mesma função em diferentes contextos ecológicos) são fortes evidências da transferência horizontal de genes (Hentschel & Hacker, 2001). As mais conhecidas: ilhas de simbiose, ilhas de resistência a antibióticos, ilhas

metabólicas e ilhas de patogenicidade. Estas são geralmente adquiridas em grupos gênicos, fragmentos de 10 a 200kb, nos quais se encontram, além dos genes, os promotores destes e integrases e transposases (Hentschel & Hacker, 2001).

2.1.3.2 Técnicas para Estudo da Variabilidade Genética

O uso de ferramentas moleculares tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos e fáceis de caracterizar as populações, seja em nível de gênero, espécie ou estirpe (Schneider & de Bruijn, 1996). A técnica de reação em cadeia da polimerase, conhecida como PCR (*polimerase chain reaction*), é utilizada em estudos filogenéticos (Eardly et al., 1992; Ueda et al., 1995) e para detecção, identificação e caracterização de estirpes de rizóbios (Harrison et al., 1992; Laguerre et al., 1994; Watson et al., 1995). Este método pode ser realizado utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores arbitrários ou complementares a determinada seqüência do genoma bacteriano. Uma variação da técnica de PCR está baseada na utilização de oligonucleotídeos iniciadores, correspondentes a seqüências repetitivas de consenso, dispersas no genoma das eubactérias [rep-PCR (de Bruijn, 1992)]. A amplificação de seqüências repetitivas intergênicas, conhecidas como ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e elementos BOX (seqüências repetitivas espalhadas no genoma), geram padrões altamente característicos, quando separadas em gel de agarose (Selenska-Pobell, 1995). Utilizando rep-PCR é possível discriminar organismos em nível de estirpe (Olive & Bean, 1999), apesar de não agrupá-las em espécies e gêneros (Ferreira & Hungria, 2002; Galli-Terasawa et al., 2003; Grange & Hungria, 2004; Kaschuk et al., 2006). A técnica permite que os oligonucleotídeos iniciadores generalizados sejam capazes de comparar diferentes bactérias dentro de uma mesma população, devido a estes oligonucleotídeos não serem específicos para gênero, espécie ou estirpe. O rep-PCR é uma ferramenta universal para estudos de variações genômicas em organismos procariontes e reflete a variabilidade do genoma por inteiro (Igual et al., 2001). As seqüências ERIC e BOX são altamente conservadas entre os rizóbios e foram utilizadas para distinguir e classificar diferentes estirpes em estudos de diversidade de *Bradyrhizobium* em solos na Polônia (Madzrak et al., 1995); para avaliar o impacto de diferentes fatores

ambientais em população de *R. leguminosarum* bv. *Viciae* (Labes et al., 1996); e em diversos outros estudos populacionais de rizóbios (de Bruijn, 1992; Selenska-Pobell et al., 1996; Sikora et al., 2002)

O RAPD (*Random Amplification of Polymorphism*) é utilizado para diferenciação entre bactérias dentro do mesmo gênero, espécie ou estirpe. Pequenos fragmentos do DNA genômico são submetidos a PCR usando oligonucleotídeos de seqüência aleatória (Hadrys et al., 1992).

O estudo do polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado, conhecido como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), pode ser utilizado para diferenciação de estirpes de rizóbios. Esta técnica baseia-se na amplificação seletiva, por PCR, de fragmentos do DNA genômico total, obtidos pela ação de enzimas de restrição (Vos et al., 1995; Olive & Bean, 1999).

A técnica de RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*, é baseada na obtenção de fragmentos de DNA utilizando endonucleases de restrição específicas. O RFLP é um método de análise de diversidade microbiana mais utilizada em genes de estrutura muito conservada (Poly et al., 2001).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos com utilização da comparação de seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que codifica o gene 16S rRNA, considerado uma região muito conservada entre bactérias, utilizado para revelar relações filogenéticas entre as espécies (Weisburg et al., 1991; Chueire et al., 2003).

2.1.3.3 Identificação de Estirpes de *Bradyrhizobium* por Soroaglutinação

Métodos sorológicos utilizando anticorpos mono e policlonais podem ser usados na identificação, quantificação e enriquecimento de bactérias específicas em extratos (Schloter et al., 1995). Os anticorpos precisam atender uma série de requisitos ligados à qualidade, tais como: determinação de reações cruzadas, localização de determinantes antigênicos nas células de interesse, características de afinidade e expressão dos determinantes antigênicos em condições ambientais (Reis et al., 1997).

A identificação sorológica de nódulos de raízes de soja contendo *Bradyrhizobium*, utilizando a técnica de soroaglutinação descrita por Lemos

(1994), mostrou-se rápida e eficiente em trabalhos de Bizarro (2004) e Carvalho (2005). O processo de obtenção de soro, utilizando coelhos, é bastante trabalhoso, é necessário realizar testes de reação cruzada para verificar a possibilidade de falsos positivos ou falsos negativos, em virtude do soro ser de baixa especificidade. Apesar destas dificuldades, tendo obtido o soro e aprovado sua especificidade, os testes são rápidos e seguros.

CAPÍTULO I

RESPOSTA À INOCULAÇÃO DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO

3.1 INTRODUÇÃO

A prática de inoculação da soja com estirpes recomendadas é comprovadamente eficiente em termos de garantir a formação de nódulos e fixação do nitrogênio, suprimindo as necessidades deste elemento para cultura. Entretanto, casos de insucesso relacionado à inoculação são descritos. O insucesso pode estar relacionado ao fato do cultivo da soja estar sujeito a diversos sistemas de manejo, o que predispõe a uma diversidade de fatores que interferem no processo de fixação biológica do nitrogênio. Respostas à inoculação em termos de aumento do número de nódulos e massa de nódulos, além da massa da parte aérea e teor do nitrogênio do tecido de plantas de soja podem variar de acordo com o preparo do solo, plantio direto ou plantio convencional, adubação mineral ou adubação orgânica.

A adubação orgânica contribui para a estabilização dos agregados do solo, melhorando a aeração e infiltração de água, diminuindo perda por evaporação e permitindo maior penetração do sistema radicular. Outro importante efeito é sobre a fertilidade do solo, com aumentos significativos de fósforo e potássio (Tanaka et al., 1992).

Ecossistemas funcionalmente ativos são resultantes das interações entre seus componentes básicos: solo, planta e organismos (Siqueira, 1994). Várias pesquisas têm demonstrado que a população microbiana do solo é dinâmica, sofre acentuada influência do ambiente e que alterações provocadas pelo uso e manejo do solo provocam modificações quantitativas e qualitativas, levando a comunidade a um novo equilíbrio (Cattelan & Vidor, 1990; Wardle & Hungria, 1994; Cattelan et al., 1997; Marchiori Júnior & Melo, 1999). O manejo dos cultivos e seus restos culturais, por exemplo, afetam a microbiota, tanto pela disponibilidade de nutrientes e pelos exudatos radiculares, como pelos efeitos indiretos, na temperatura e umidade do solo. Por sua vez, o melhor desenvolvimento de alguns microrganismos, como os envolvidos com a

disponibilidade de nitrogênio e fósforo, implicarão em maior produção vegetal. O estímulo na biomassa microbiana, que normalmente representa de 1% a 4% da fração de carbono orgânico do solo, também é importante para a imobilização temporária de nutrientes que, depois, serão parcial e periodicamente liberados para as plantas, diminuindo as perdas por lixiviação (Hungria et al., 1994).

Os diferentes tipos de manejos do solo e de culturas têm demonstrado interferir na FBN. No plantio direto da soja, em comparação com o plantio convencional, Voss & Sidiras (1985) obtiveram maior número de nódulos e extensão da nodulação para camadas mais profundas no solo no plantio direto. Maior número de células de rizóbio, também foi encontrado em solos do Paraná, com a prática do plantio direto, por Hungria et al. (1997).

O presente estudo se propôs avaliar a resposta à inoculação da soja influenciada pelos fatores adubação e preparo do solo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O campo experimental localiza-se na Estação Experimental Agronômica da UFRGS em Eldorado do Sul/RS. O estudo foi realizado sobre um 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. A seqüência de culturas desde o primeiro ano de instalação, incluiu três cultivos de soja. A seqüência de culturas foi Soja (2000/2001), Aveia + Ervilhaca, Milho (2001/2002), Aveia Preta, Soja (2002/2003), Aveia + Ervilhaca, Milho (2003/2004), Aveia Preta, Soja (2005/2006).

Os tratamentos escolhidos envolvem métodos de preparo do solo, tipos de adubação e uso e não uso da inoculação. Os métodos de preparo do solo incluem: (i) plantio direto (PD); e (ii) preparo convencional (PC). Os tipos de adubação contemplam: (i) adubação mineral (apenas fósforo e potássio) e (ii) adubação orgânica, ambas nas dosagens para correção da acidez e reposição de nutrientes, baseados em análise de solo de acordo com Comissão... (1995), conforme atributos químicos do solo no Apêndice 1. A fonte de adubo orgânico utilizado foi cama de aviário, a sua composição é apresentada no Apêndice 2. Os tratamentos de inoculação usados são: (i) inoculado sempre na semeadura da soja e (ii) não inoculado. A inoculação foi realizada utilizando-se inoculante turfoso (200g de inoculante para 50 kg de sementes), cedido pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), contendo em quantidades semelhantes as estirpes SEMIA (587, 5019, 5079 e 5080).

Os blocos são formados de parcelas principais, em número de oito, com dimensões de 25m x 30m (Figura 1), com sete delas recebendo os tratamentos de preparo do solo, em subparcelas de 7,5m x 25m e uma parcela de campo nativo. As combinações dos tratamentos envolvendo os sistemas de culturas, métodos de preparo do solo, níveis tecnológicos com relação à nutrição e

inoculação (Figura 1), correspondendo a diversos sistemas de produção agrícola.

Avaliou-se a nodulação, teor de nitrogênio mineral do solo, massa da parte aérea e teor de nitrogênio total do tecido das plantas. A avaliação da nodulação da soja foi realizada nos diferentes tratamentos do experimento de campo, utilizando-se amostras aleatórias de sete plantas por tratamento e verificando-se o peso da matéria seca da parte aérea, número de nódulos e peso de nódulos. A avaliação foi realizada no período vegetativo do quinto nó e no início do 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).

Amostrou-se o solo na camada de 0 a 20 cm, com o objetivo de monitorar a concentração de nitrogênio mineral. O teor de nitrogênio mineral foi determinado nos estádios V2, V5, V8, R2 e R8 (Tabela 1). Para tanto, foram coletados ao acaso 10 subamostras de solo em cada tratamento para formar uma amostra composta. O processo consistiu na homogeneização da amostra, pesagem de 50g de solo e transferência para um frasco com capacidade de 300mL contendo 200mL de solução KCl (2M), outra porção foi armazenada em lata vedada para determinação posterior da umidade. O método de determinação do nitrogênio mineral do solo está descrito em Tedesco et al. (1995).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com sete repetições para número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea e três repetições para teor de nitrogênio no tecido das plantas de soja, utilizando arranjo fatorial (2x2x2) com unidades experimentais constituídas de faixas. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Duncan à 5%. Também, determinou-se a correlação entre nitrogênio mineral do solo e massa de nódulos.

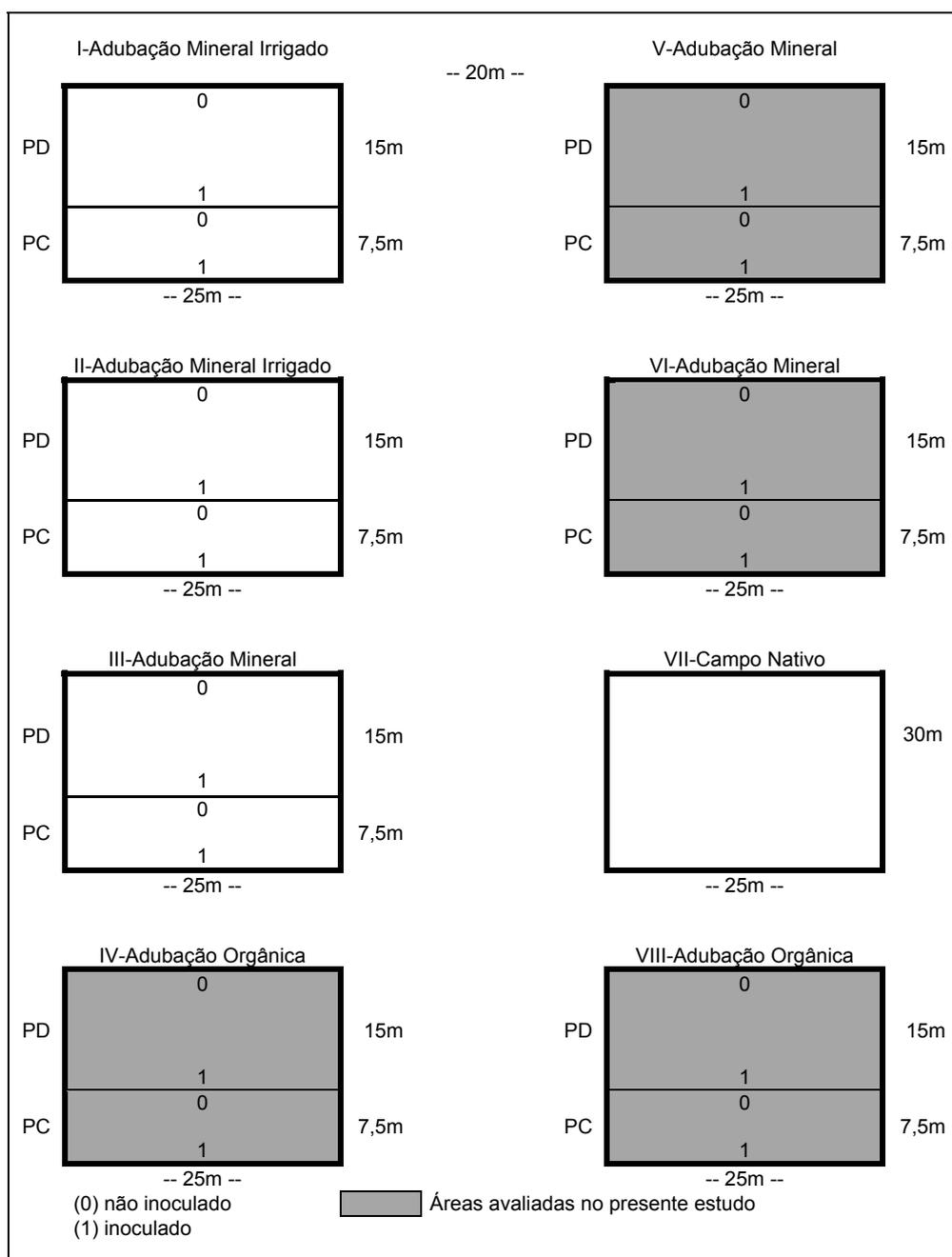


Figura 1. Esquema da área experimental, PD – plântio direto, PC – plântio convencional

As amostragens e determinações de campo foram relacionadas às fases fenológicas da cultura da soja (Tabela 1).

Tabela 1. Fases fenológicas da cultura da soja e respectivas simbologias

Símbolo	Estádio Denominação	Descrição 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)

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Resposta à inoculação

Os resultados da análise estatística das variáveis número de nódulos, massa de nódulos, massa da parte aérea e teor de nitrogênio no tecido das plantas de soja, avaliados nos estádios do quinto nó e início do florescimento, estão dispostos em três grupos de tabelas. No primeiro grupo (Apêndices 3 e 4) verifica-se que causas da variação interferiram significativamente nas variáveis estudadas, podendo ocorrer efeitos simples ou de interações. A Tabela 2 permite a visualização dos efeitos da adubação (mineral ou orgânica), preparo do solo (plantio direto ou plantio convencional) e inoculação (inoculado ou não inoculado). A interação entre fatores estudados pode ser visualizada no terceiro grupo de tabelas (Tabelas 3 a 6).

3.3.2 Número e massa de nódulos

O número e massa de nódulos avaliados em dois estádios (V5 e R1), do ano agrícola 2005/2006, podem ser observados nas Tabelas 2, 3 e 4. É necessário salientar que o campo experimental encontra-se no seu quinto ano de condução, sendo o terceiro cultivo de soja. As parcelas inoculadas e não inoculadas estão dispostas lado a lado (Figura 1) sem nenhuma barreira que impeça alguma migração das estirpes. Provavelmente houve migração de estirpes de *Bradyrhizobium* das parcelas inoculadas para as não inoculadas, o que explica a presença de nódulos nas parcelas não inoculadas.

Houve resposta a inoculação em termos de aumento da massa de nódulos apenas no estádio do início do florescimento (Apêndice 3), representando um aumento de 36% (Tabela 2). Não se verificou efeito da inoculação sobre aumento do número de nódulos em ambos estádios avaliados, nem na massa de nódulos no estádio do quinto nó.

Encontraram-se diferenças em termos de número de nódulos e massa de nódulos associados ao preparo do solo, com exceção do número de nódulos no estágio do início do florescimento (Apêndice 3). O PD determinou aumentos tanto em número quanto em massa de nódulos. Este efeito parece estar relacionado aos teores de N mineral do solo que são menores no PD (Figura 2), haja visto o conhecido efeito de depressão da nodulação por nitrogênio (Munns, 1977; Gulden & Vessey, 1998).

A adubação mineral ou orgânica (Apêndice 3 e Tabela 2) influenciou o número de nódulos, sendo que no estágio do quinto nó encontrou-se maior número na adubação orgânica e no estágio do início do florescimento houve uma inversão, encontrando-se mais nódulos na adubação mineral. Apesar de não se observar aumentos na massa de nódulos.

Encontrou-se interação entre adubação e preparo do solo na massa de nódulos no estágio do quinto nó (Apêndice 3), sendo que, dentro da adubação mineral, o PD determinou aumento de 267% (Tabela 4) comparado ao PC e, dentro da adubação orgânica, o PD determinou aumento de 88% comparado ao PC. Alves et al. (2002) atribuem o aumento da massa de nódulos na soja, no sistema PD comparado ao PC, à menor disponibilidade de nitrogênio, geralmente encontrada no plantio direto.

3.3.3 Massa da parte aérea e nitrogênio total do tecido

A inoculação promoveu aumento da massa da parte aérea e teor de nitrogênio nos dois estádios avaliados (Apêndice 4 e Tabelas 2). Os aumentos de massa da parte aérea (Tabela 2) promovidos pelo efeito da inoculação foram de 17% no estágio do quinto nó e 46% no estágio do início do florescimento. Já os aumentos nos teores de nitrogênio do tecido (Tabela 2) foram de 27% no estágio do quinto nó e 39% no estágio do início do florescimento. Observou-se um aumento no teor do nitrogênio do tecido no estágio do início do florescimento associado ao PD, aumento de 21%. Alves et al. (2003) descrevem que tanto a matéria seca da parte aérea, quanto o nitrogênio total acumulado no tecido tendem a ser maiores a medida que a FBN tenha sido mais eficiente.

A adubação orgânica determinou aumento de massa da parte aérea e teor de nitrogênio independente do estágio avaliado (Tabela 2). Este resultado

parece estar relacionado à maior fertilidade dos blocos que receberam adubação orgânica (Apêndice 1).

Ocorreu interação, somente no estágio do quinto nó, entre o fator adubação e preparo do solo (Tabela 2) para massa da parte aérea e teor de nitrogênio do tecido. Para a massa da parte aérea no estágio do quinto nó (Tabela 5) observa-se a média do preparo do solo dentro da adubação mineral e dentro da adubação orgânica, na adubação mineral o PD determinou um aumento de 32% na massa da parte aérea comparado ao PC e na adubação orgânica houve uma inversão, o PC determinou aumento de 28% na massa da parte aérea comparado ao PD. Para os teores de nitrogênio no tecido observados no estágio do quinto nó (Tabela 6) na adubação mineral não ocorreu diferença entre os preparos e, na adubação orgânica, o PD determinou aumento de 31% no teor de nitrogênio do tecido comparado ao PC. Diversos trabalhos descrevem o PD como o sistema que determina as melhores condições tanto para a cultura da soja quanto para as estirpes de *Bradyrhizobium* (Ferreira et al., 2000; Hungria & Vargas, 2000; Alves et al., 2003)

Tabela 2. Efeito simples dos fatores adubação, preparo e inoculação para as variáveis número de nódulos, massa de nódulos, massa da parte aérea e nitrogênio total no tecido no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja. Ano agrícola de 2005/2006

Fatores em estudo	Número de nódulos		Massa de nódulos		Massa da parte aérea		Nitrogênio total do tecido	
	V5 ¹	R1 ²	V5	R1	V5	R1	V5	R1
	----- nº planta ⁻¹ -----		----- mg planta ⁻¹ -----		----- g planta ⁻¹ -----		----- mg -----	
	Adubação							
Mineral	9 b	33 a	28 a	146 a	4,0 b	17,7 b	115 b	546 b
Orgânica	13 a	24 b	25 a	131 a	4,9 a	22,1 a	150 a	691 a
	Preparo							
PD	17 a	33 a	38 a	167 a	4,5 a	20,4 a	137 a	665 a
PC	5 b	24 a	14 b	110 b	4,4 a	19,4 a	129 a	572 b
	Inoculação							
Não inoculado	10 a	30 a	24 a	117 b	4,1 b	16,2 b	117 b	518 b
Inoculado	11 a	27 a	29 a	159 a	4,8 a	23,6 a	149 a	719 a
CV %	24,6	27,6	29,1	18,5	15,2	20,9	18,7	11,3

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do início do florescimento

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 3. Número de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 7 repetições. Ano agrícola de 2005/2006

Preparo do Solo	Número de nódulos											
	Estádio V5 ¹						Estádio R1 ²					
	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média
	Não Inoc. ³	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado	
	----- n° planta ⁻¹ -----											
PD	15	19	17	18	18	18	40	41	40	34	18	26
PC	3	4	3	7	9	8	22	33	27	24	20	22
Média	9	11		12	13		31	37		29	19	
CV %	24,6						27,6					

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do início do florescimento; ³ Não inoculado

Tabela 4. Massa seca de nódulos no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 7 repetições. Ano agrícola de 2005/2006

Preparo do Solo	Massa de nódulos											
	Estádio V5						Estádio R1					
	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média
Não Inoc.	Inoculado	Não Inoc.		Inoculado	Não Inoc.		Inoculado	Não Inoc.		Inoculado		
	----- mg planta ⁻¹ -----											
PD	38	51	44 a	28	37	32 a	140	196	168	105	226	165
PC	10	14	12 b	19	15	17 b	129	118	123	94	98	96
Média	24	32		37	26		134	157		99	162	
CV %	29,1						18,5					

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do início do florescimento; ³ Não inoculado

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 5. Massa seca da parte aérea no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 3 repetições. Ano agrícola de 2005/2006

Preparo do Solo	Massa da Parte Aérea											
	Estádio V5 ¹						Estádio R1 ²					
	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média
	Não Inoc. ³	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado	
	----- g planta ⁻¹ -----											
PD	2,5	4,3	3,4 b	5,2	5,8	5,5 a	15,8	24,1	19,9	18,7	23,1	20,9
PC	4,5	4,5	4,5 a	4,2	4,5	4,3 b	12,4	18,1	15,5	18,7	28,4	23,2
Média	3,5	4,4		4,7	5,1		14,1	21,4		18,7	25,7	
CV %	15,2						20,9					

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do início do florescimento; ³ Não inoculado

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 6. Nitrogênio total no tecido no estágio do quinto nó (V5) e no início do florescimento (R1) da soja submetida a dois preparos do solo, adubação mineral e orgânica, inoculada e não inoculada. Média de 3 repetições. Ano agrícola de 2005/2006

Preparo do Solo	Nitrogênio total no tecido											
	Estádio V5						Estádio R1					
	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média	Adubação mineral		Média	Adubação orgânica		Média
	Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado		Não Inoc.	Inoculado	
	----- mg planta ⁻¹ -----											
PD	65	140	102 a	160	182	171 a	510	700	605	643	807	725
PC	123	133	129 a	119	141	130 b	345	631	488	576	736	656
Média	94	136		139	161		427	665		610	772	
CV %	18,7						11,3					

¹ Estádio do quinto nó; ² Estádio do início do florescimento; ³ Não inoculado

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

3.3.4 Nitrogênio mineral do solo

O teor de nitrogênio mineral do solo, nos diferentes tratamentos, pode ser observado na Figura 2. Houve grande variação nos teores de N mineral do solo nos diferentes tratamentos e ao longo das avaliações. Observa-se que os teores de nitrogênio mineral do solo diminuíram ao passar do tempo.

Os teores de nitrogênio mineral não parecem ter sido influenciados pelas precipitações (Apêndice 5) que ocorreram no período, haja visto que, com exceção da primeira avaliação V2 (11/01/06), as outras avaliações (V5, R1 e R8) foram realizadas nos meses de fevereiro e março, período em que ocorreu déficit hídrico.

O sistema de preparo PC apresentou maior quantidade de nitrogênio mineral quando comparado ao PD (Figura 2). Os valores de nitrogênio mineral do solo observados, dentro de cada estágio, apresentaram a seguinte amplitude: 16 a 34 mgkg⁻¹ (V2); 11 a 18 mgkg⁻¹ (V5); 7 a 28 mgkg⁻¹ (R1); 6 a 15 mgkg⁻¹ (R8); 3 a 16 mgkg⁻¹ (20 dias após colheita). Os valores máximos de nitrogênio mineral observados em cada estágio foram determinados em parcelas do PC. Foram realizadas amostragens no Campo Nativo, com amplitude de 0,1 a 1,7 mgkg⁻¹ de N mineral. Quando o preparo é minimizado, o principal fator determinante da menor disponibilidade de N é a imobilização microbiana (Salet, 1994; Diekow, 2000; Vargas, 2002; Da Ros, 2004), o que pode explicar menores teores de N encontrados no PD, quando comparado ao PC.

Os tratamentos que apresentaram maiores teores de nitrogênio mineral foram os em que se observaram menor número de nódulos (Figura 2). Já é conhecido o efeito inibitório do nitrogênio mineral do solo sobre a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Avaliações anteriores na mesma área (Bizarro, 2004) determinaram no primeiro cultivo (2000/2001) amplitude de 2 a 17mgkg⁻¹ e no segundo cultivo (2002/2003) 1 a 20mgkg⁻¹ de nitrogênio mineral do solo, o que evidencia a elevação dos níveis de nitrogênio mineral encontrados neste terceiro cultivo da soja na mesma área.

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 (Figura 2). 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, aumenta a imobilização do nitrogênio e o potencial de desnitrificação, causando um decréscimo do nitrogênio mineral do solo (Doran, 1980).

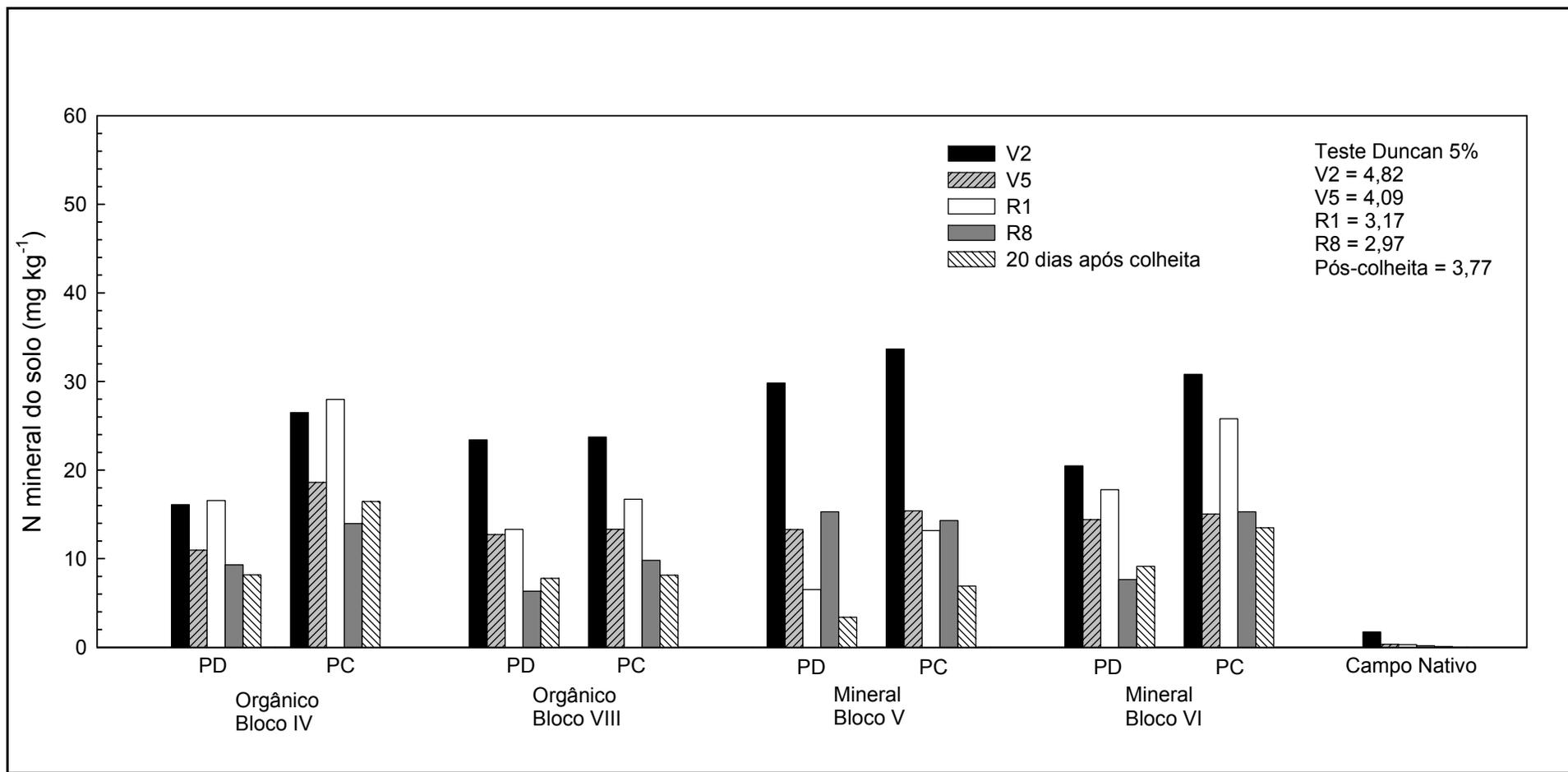


Figura 2. Teores de nitrogênio mineral do solo sob cultivo de soja, avaliados nos estádios: V2, V5, R1, R8 e 20 dias após colheita referentes ao ano agrícola de 2005/2006.

3.3.5 Efeito do teor de nitrogênio mineral do solo na nodulação

Observa-se uma relação negativa entre o teor de N mineral do solo e a massa seca de nódulos (Figura 3). O teste de correlação foi significativo ao nível de 5%, sendo que o valor de 0,82 indica uma relação estreita entre estas variáveis. Trabalhos desenvolvidos na década de 70 e 80 já apontavam os efeitos negativos do nitrogênio mineral sobre a nodulação (Freire et al., 1975; Selbach, 1978; Streeter, 1988), além de trabalhos desenvolvidos recentemente por Bizarro (2004), nos quais observou-se redução da massa de nódulos quando os valores de nitrogênio mineral do solo superaram 12mg kg^{-1} , também observados neste estudo. Tais resultados indicam que o nitrogênio mineral do solo pode interferir negativamente sobre a nodulação, sobretudo em valores superiores a 12mg kg^{-1} .

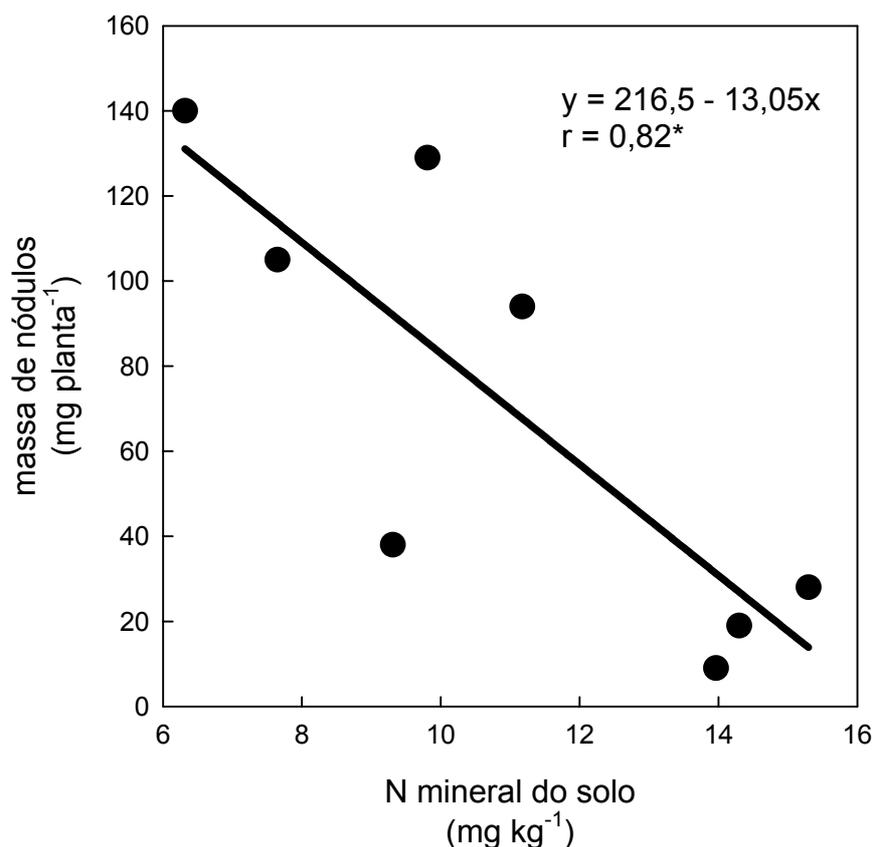


Figura 3. Efeito do N mineral do solo sobre a massa seca de nódulos. Nódulos avaliados nos estádios V5 e R1 e nitrogênio mineral no estádio R1. Dados do ano agrícola de 2005/2006.

3.4 CONCLUSÕES

Os dados obtidos e discutidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- Houve resposta à inoculação em termos de aumento de massa de nódulos, massa da parte aérea e teor de nitrogênio no tecido das plantas de soja.

- Concentrações de nitrogênio mineral acima de 12mg kg^{-1} de solo prejudicaram o processo de fixação biológica do nitrogênio. À medida que os teores de nitrogênio mineral do solo aumentam, reduz a massa de nódulos.

- O plantio direto foi o preparo do solo que reuniu as melhores condições para o processo de fixação biológica do nitrogênio determinando aumentos de número e massa de nódulos, massa da parte aérea e teor de nitrogênio no tecido das plantas de soja.

CAPÍTULO II

RESISTÊNCIA AO NITROGÊNIO MINERAL NA INTERAÇÃO SOJA MICROSSIMBIONTE

4.1 INTRODUÇÃO

Os teores de nitrogênio nos solos brasileiros, de um modo geral, situam-se na faixa de 0,05 a 0,30%, quantidades insuficientes para a produção das diferentes culturas agrícolas. Neste contexto o processo de fixação biológica do nitrogênio constitui-se em uma importante alternativa de adição de nitrogênio no sistema de forma sustentável (Gulden & Vessey, 1997).

Apesar dos solos apresentarem naturalmente baixos teores de nitrogênio, a melhoria dos sistemas de produção, como a adoção do plantio direto, conduz a uma menor taxa de decomposição da matéria orgânica do solo. Nos primeiros anos de cultivo pode ocorrer deficiência de N em culturas exigentes para este nutriente, como o milho. Em longo prazo, o aumento do teor de matéria orgânica do solo conduz ao aumento do reservatório de N potencialmente mineralizável, compensando a menor taxa de decomposição. Este processo pode ser acelerado em sistema de rotação de culturas envolvendo leguminosas (Muzzili et al., 1983; Bayer & Mielniczuk, 1997; Rheinheimer et al., 1998).

O aumento do reservatório de N é interessante por possibilitar atender parte das necessidades de culturas como o milho. O preparo e/ou plantio das culturas gera mobilização do solo em torno do sulco de semeadura, favorecendo a mineralização. Entretanto a disponibilização do N via mineralização é insuficiente para atender toda a necessidade deste nutriente para as culturas, mas pode ser suficiente para causar efeito inibitório sobre a fixação biológica do nitrogênio na soja.

O efeito inibitório do nitrogênio sobre a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é bem conhecido (Gulden & Vessey, 1998; van Kessel & Hartley, 2000), entretanto há escassez de trabalhos sobre a magnitude do efeito do nitrogênio mineral sobre a interação de diferentes cultivares de soja com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Sabendo-se que o nitrogênio mineral presente no solo pode inibir a nodulação e fixação biológica com o aumento de sua concentração, o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de interações entre estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja tolerante a concentrações maiores de nitrogênio mineral no solo sem que haja danos a FBN.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em casa de vegetação utilizando-se vasos “Leonard” modificados, contendo areia mais vermiculita (1/2, v/v) e solução nutritiva de Norris esterelizados (Vincent, 1970). O pH ajustado a 6,8, segundo Andrade & Hamakawa (1994). O experimento foi conduzido em fevereiro de 2007 com amplitude térmica de 15 a 36°C.

Os tratamentos escolhidos envolvem cultivares de soja, estirpes de *Bradyrhizobium* e doses de nitrogênio. Utilizaram-se quatro cultivares de soja com variações nos ciclos desde precoce até tardio (Tabela 1). As estirpes de *Bradyrhizobium* foram a SEMIA 5019 (= 29 w, BR 29), SEMIA 587 (BR 96), SEMIA 5079 (= CPAC 15) e SEMIA 5080 (= CPAC 7), cedidas pela Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Além de combinar quatro diferentes variedades de soja com quatro diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, foram utilizadas quatro concentrações de nitrogênio: 0mM, 8mM, 16mM e 24mM adicionados na forma de nitrato de amônia, diretamente aos vasos em uma única vez, após uma semana de transplante das plântulas de soja para os vasos definitivos. A maior concentração de nitrogênio (24mM) foi definida com base na necessidade total de nitrogênio para que se obtivesse 15g de massa seca da parte aérea, ou seja aproximadamente 0,6g de N (solução $0,6\text{g L}^{-1} = 21,4\text{mM}$ de N), aproximadamente 24mM. As outras duas concentrações são múltiplas de oito (8mM e 16mM) e, uma testemunha sem nitrogênio (0mM).

As sementes de soja foram previamente desinfestadas através de imersão em álcool 70% durante três minutos, posteriormente em solução de hipoclorito de sódio (3%) diluído a 20% por dois minutos, sendo em seguida lavadas repetidas vezes em água destilada esterilizada. Inicialmente foi realizada a pré-germinação e após quatro dias procedeu-se o transplante,

colocando-se quatro plântulas por vaso. Passada uma semana do transplante foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Avaliou-se o número de nódulos, a massa de nódulos e a massa da parte aérea das plantas de soja. As plantas foram colhidas no início do florescimento, período em que todas estavam em início do florescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 4x4x4 (4 cultivares de soja, 4 estirpes de *Bradyrhizobium*, 4 concentrações de N), com três repetições. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 1. Cultivares de soja com respectivos ciclos de cultura, ciclos vegetativos, origens e ano de lançamento.

Cultivar de soja	Ciclo da cultura	Ciclo vegetativo	Origem	Ano lançamento
CD 208	Precoce	54 dias	Coodetec	2003
CD 216	Precoce	52 dias	Coodetec	2003
BRS Tarena	Semi tardio	68 dias	Embrapa Trigo/ Embrapa Soja	2002
Fepagro RS-10	Tardio	75 dias	Fepagro	1995

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se efeito de interação sobre todas variáveis avaliadas, número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea (Tabela 2). Este resultado indica que o efeito do teor de nitrogênio sobre a fixação biológica depende tanto da cultivar de soja quanto da estirpe de *Bradyrhizobium* que estão interagindo. Diferenças quanto à eficiência na FBN na interação *Bradyrhizobium* e genótipos de soja foram relatados por Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000).

Tabela 2. Valores do teste F para número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea avaliado no início do florescimento das plantas de soja

Causas da variação	GL	Nº nódulos	Massa de nódulos	Massa da Parte Aérea
Variedade de soja (A)	3	142,91***	214,86***	50,73***
Estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> (B)	3	206,62***	551,22***	0,33 ^{ns}
Concentração de N (C)	3	1031,80***	3032,57***	20,58***
A x B	9	17,00***	45,90***	4,43***
B x C	9	31,49***	119,13***	1,68***
A x C	9	26,12***	67,18***	2,66***
A x B x C	27	23,12***	54,06***	2,03***
Resíduo	128			
CV (%)		13,52	17,19	21,07

*, **, ***: significativos a 5,0; 1,0 e 0,1 % de probabilidade utilizando Tukey.

A Tabela 3 apresenta o número e massa de nódulos e massa da parte aérea das plantas de soja, frente às diferentes concentrações de nitrogênio avaliados em quatro cultivares inoculadas com quatro estirpes de *Bradyrhizobium*. O cultivar de soja que se destacou em apresentar nódulos mesmo na concentração de 24mM de N foi o BRS Torena, enquanto que na massa da parte aérea foi o CD 208. Já as estirpes que determinaram aumentos na nodulação e na massa da parte aérea de plantas de soja foram as SEMIA 5019 e SEMIA 587. O cultivar de soja que se destacou por apresentar nódulos

na maior dose de N foi o BRS Torena, assim como a estirpe foi a SEMIA 5019 (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de diferentes cultivares de soja e estirpes de *Bradyrhizobium* a doses de nitrogênio sobre número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea. Experimento conduzido em vasos “Leonard” com solução nutritiva e três repetições.

Fator	Numero de nódulos				Massa de nódulos				Massa da Parte aérea			
	----- nº planta ⁻¹ -----				----- mg planta ⁻¹ -----				----- g planta ⁻¹ -----			
Conc. de N ¹ (mM)	0	8	16	24	0	8	16	24	0	8	16	24
Cultivar												
BRS Torena	55 aA	44 aB	13 bC	3 aD	133 aA	108 aB	16 bC	5 aD	3,5 aB	4,3 bA	4,5 bA	4,5 bA
CD 208	31 cA	35 bA	22 aB	0 bC	59 cB	95 aA	44 aC	0 bD	3,9 aC	5,0 aB	5,8 aA	5,0 aB
CD 216	46 bA	29 bB	9 cC	0 bD	103 bA	108 aA	15 bB	0 bC	1,3 cB	3,5 cA	3,4 cA	3,3 cA
Fepagro RS-10	25 dA	9 cB	9 cB	0 bC	77 cA	26 bB	15 bC	0 bD	2,3 bB	3,1 cA	2,8 dA	3,2 cA
Estirpe												
SEMIA 5019	55 aA	40 aB	26 aC	2 aD	139 aA	114 aB	58 aC	4 aD	2,9 abC	3,8 bcB	4,5 aA	4,1 abAB
SEMIA 587	45 bA	43 aA	21 aB	0 bC	99 bA	112 aA	37 bB	0 bC	2,5 bC	4,5 aA	3,5 bB	4,5 aA
SEMIA 5079	26 cA	22 bA	8 bB	0 bC	54 cA	61 bA	10 cB	0 bC	2,6 bD	4,1 abB	4,6 aA	3,4 cC
SEMIA 5080	30 cA	12 cB	3 cC	0 bD	82 bA	43 cB	2 dC	0 bC	3,0 aC	3,6 cB	3,9 bAB	4,0 bA

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna, dentro de cada fator, e maiúscula(s) na linha, dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1 Concentração de nitrogênio

Encontrou-se (Tabela 3) maior número e massa de nódulos nos tratamentos sem adição de nitrogênio, reforçando o conhecido efeito inibitório do nitrogênio sobre a nodulação (Gulden & Vessey, 1998; van Kessel & Hartley, 2000). Já a massa da parte aérea foi maior nos tratamentos que receberam nitrogênio, entretanto não demonstrou diferenças entre as doses 8, 16 e 24mM de nitrogênio, tanto quando se compara as médias obtidas pelos cultivares de soja quanto pelas obtidas pelas estirpes.

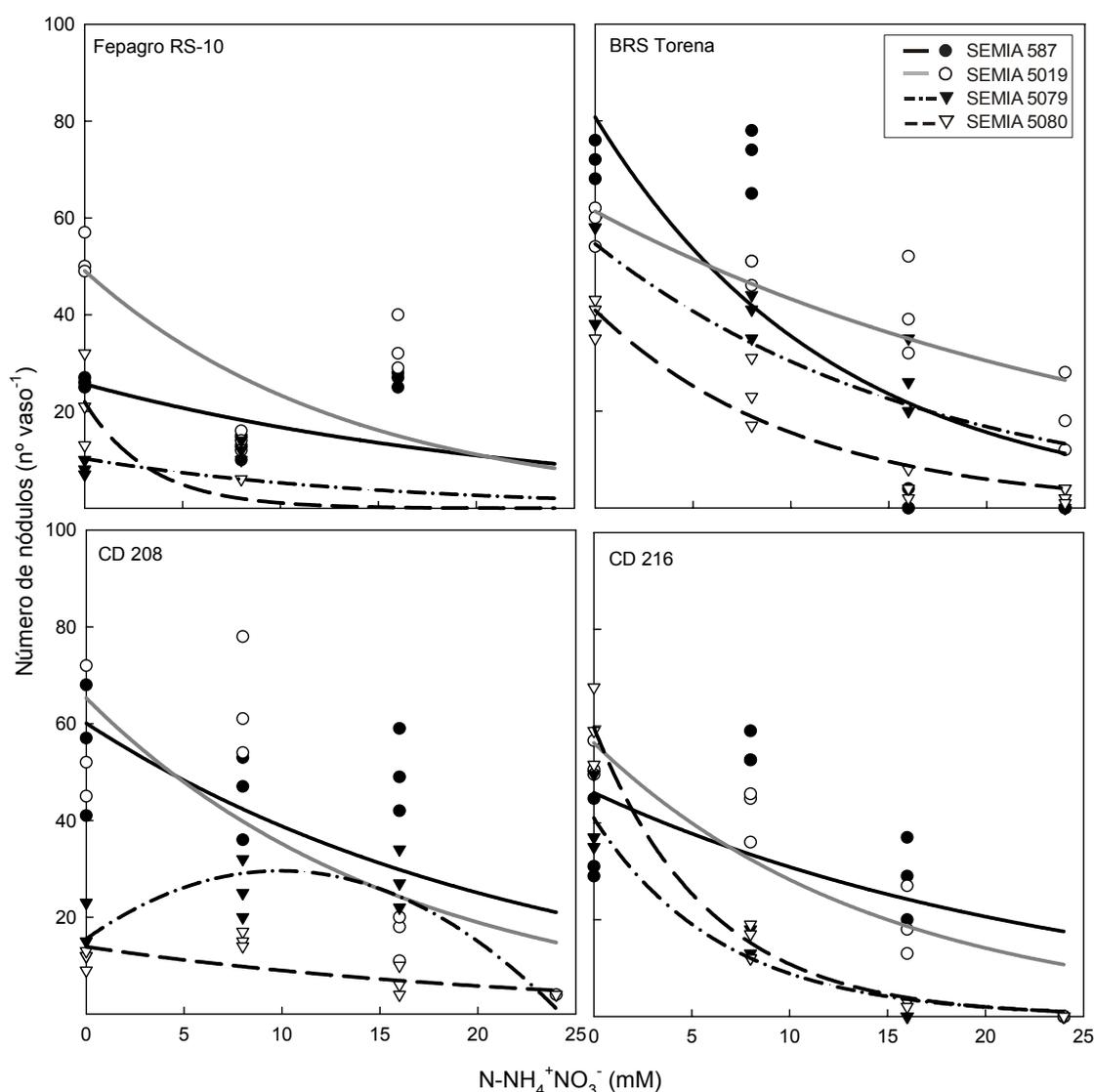


Figura 1. Relação entre número de nódulos e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja

A relação entre as variáveis avaliadas (número e massa de nódulos e massa da parte aérea) e o teor de nitrogênio, em solução nutritiva, em interação com diferentes estirpes e cultivares de soja são apresentados nas

Figuras (1,2 e 3) e, quando ajustadas, as equações de regressão na Tabela 4. Os mesmos dados estão apresentados em tabelas nos Apêndices (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

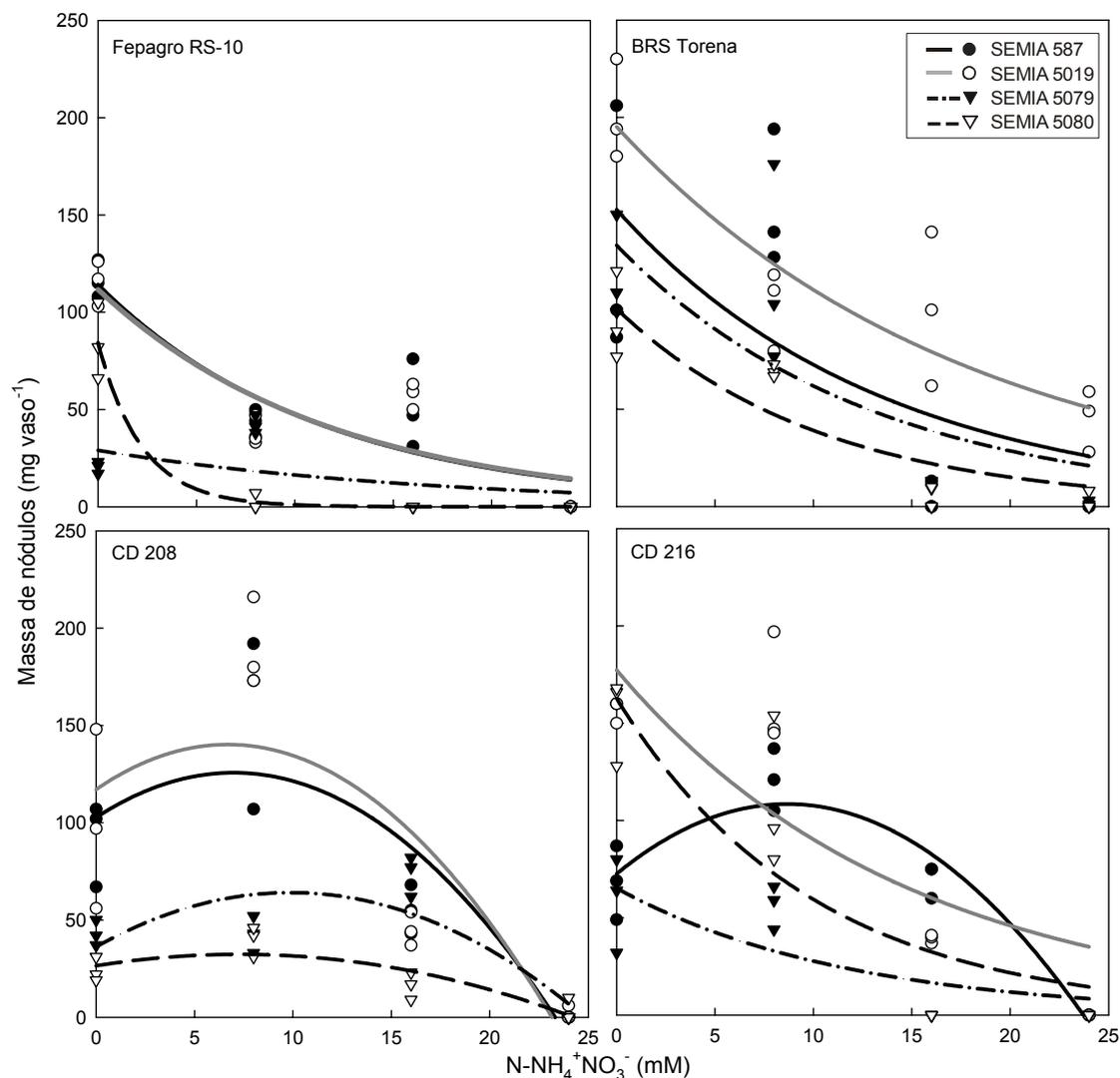


Figura 2. Relação entre massa de nódulos e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja

O número de nódulos (Figura 1 e Tabela 4) ajustou-se a funções exponenciais, com exceção da interação entre a estirpe SEMIA 5080 e cultivar CD 208, ocorrendo decréscimo do número de nódulos à medida que aumenta a dose de nitrogênio em solução. A massa de nódulos (Figura 2 e Tabela 4), assim como o número de nódulos, apresentou decréscimo à medida que aumentou o teor de nitrogênio em solução. Exceções observadas nas interações de estirpes com a cultivar CD 208 e

especificamente a interação CD 216 com a SEMIA 587, casos em que houve um aumento na massa de nódulos na concentração 8mM quando comparadas a ausência do nitrogênio, sendo que o aumento da dose de nitrogênio a partir daí determinou redução da massa de nódulos. Provavelmente, por esta razão, nestes casos excepcionais houve melhor ajuste de funções polinomiais que descrevem melhor este comportamento. Nos outros casos o melhor ajuste foi de funções exponenciais.

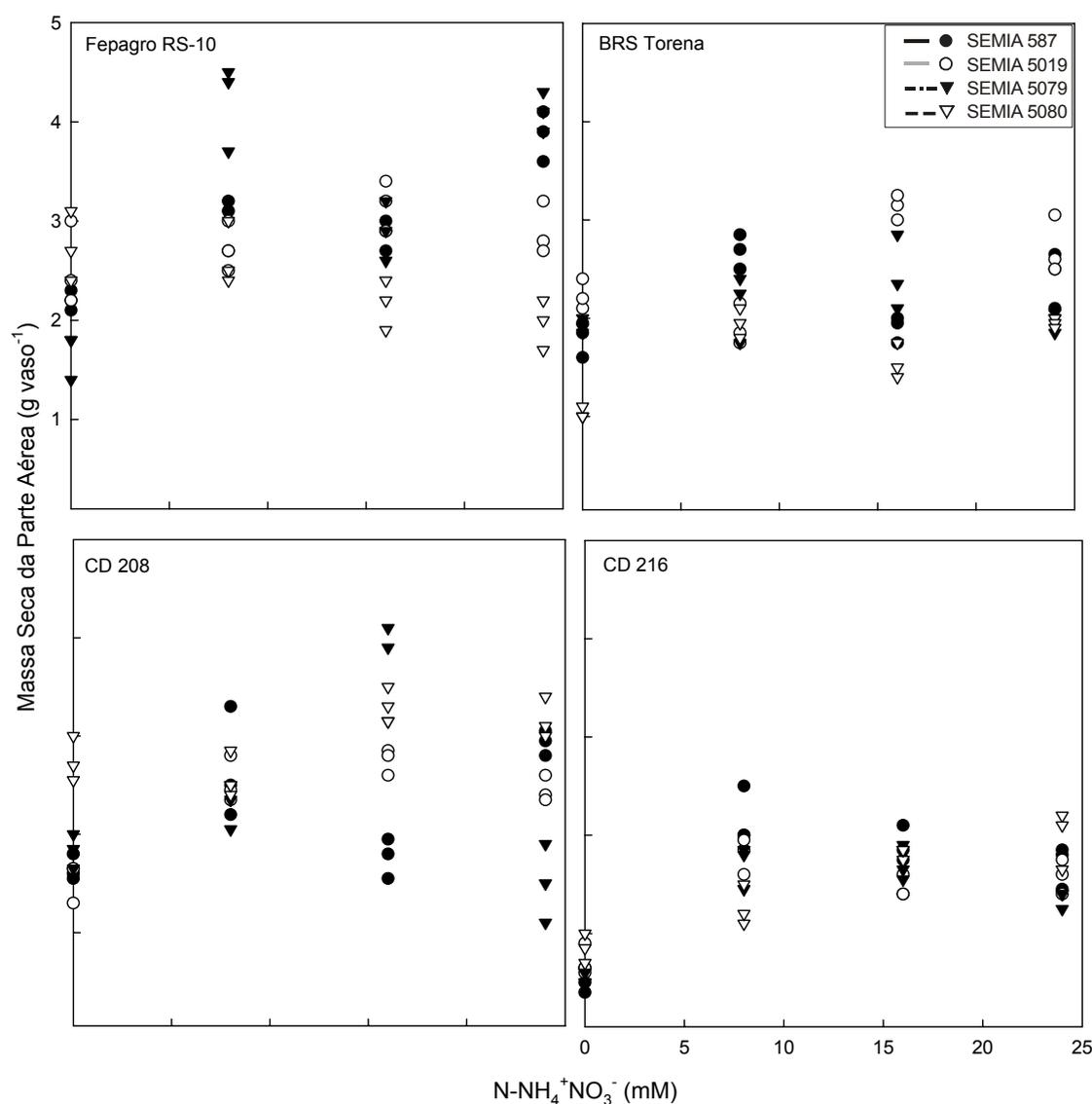


Figura 3. Relação entre massa seca da parte aérea e teores de nitrogênio em solução nutritiva avaliados em interações com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja

Não se encontrou ajuste de função para descrever o comportamento da massa da parte aérea na interação cultivar de soja e estirpe de *Bradyrhizobium*.

Tabela 4. Equações de regressão ajustadas aos dados de número de nódulos e massa de nódulos, em função de diferentes doses de nitrogênio e cultivares de soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium*

Cultivar e estirpe	Número de nódulos		Massa de nódulos	
	----- n° vaso ⁻¹ -----		----- mg vaso ⁻¹ -----	
RS 10 / SEMIA 587	$y = 114,26e^{(-0,0882x)**}$	R ² =0,79	$y = 25,67e^{(-0,0427x)*}$	R ² =0,30
RS 10 / SEMIA 5019	$y = 111,69e^{(-0,0853x)**}$	R ² =0,76	$y = 49,08e^{(-0,0742x)**}$	R ² =0,56
RS 10 / SEMIA 5079	$y = 28,94e^{(-0,0577x)*}$	R ² =0,24	$y = 10,26e^{(-0,0674x)**}$	R ² =0,42
RS 10 / SEMIA 5080	$y = 84,33e^{(-0,4483x)**}$	R ² =0,95	$y = 22,00e^{(-0,03017x)**}$	R ² =0,82
BRS Torena / SEMIA 587	$y = 152,62e^{(-0,0739x)**}$	R ² =0,47	$y = 80,75e^{(-0,0821x)**}$	R ² =0,66
BRS Torena / SEMIA 5019	$y = 195,23e^{(-0,0561x)**}$	R ² =0,78	$y = 61,33e^{(-0,0351x)**}$	R ² =0,74
BRS Torena / SEMIA 5079	$y = 134,27e^{(-0,0775x)**}$	R ² =0,58	$y = 54,57e^{(-0,059x)**}$	R ² =0,74
BRS Torena / SEMIA 5080	$y = 101,64e^{(-0,0958x)**}$	R ² =0,79	$y = 40,86e^{(-0,0967x)**}$	R ² =0,89
CD 208 / SEMIA 587	$y = 102,7x^2+6,59x-4,71**$	R ² =0,68	$y = 60,09e^{(-0,0438)*}$	R ² =0,44
CD 208 / SEMIA 5019	$y = 117,1x^2+6,91x-0,52**$	R ² =0,58	$y = 65,29e^{(-0,0619x)**}$	R ² =0,58
CD 208 / SEMIA 5079	$y = 36,2x^2+5,65x-0,286**$	R ² =0,54	$y = 15,53x^2+2,84x-0,14**$	R ² =0,79
CD 208 / SEMIA 5080	$y = 26,47x^2+1,62x-0,11**$	R ² =0,63	$y = 13,89e^{(-0,0437x)*}$	R ² =0,43
CD 216 / SEMIA 587	$y = 72,57x^2+8,3x-0,479**$	R ² =0,87	$y = 46,24e^{(-0,0403x)*}$	R ² =0,32
CD 216 / SEMIA 5019	$y = 177,38e^{(-0,0675x)**}$	R ² =0,67	$y = 56,53e^{(-0,0693x)**}$	R ² =0,82
CD 216 / SEMIA 5079	$y = 65,20e^{(-0,0855x)**}$	R ² =0,93	$y = 41,02e^{(-0,1534x)**}$	R ² =0,93
CD 216 / SEMIA 5080	$y = 162,9e^{(-0,1009x)**}$	R ² =0,77	$y = 59,78e^{(-0,1712x)**}$	R ² =0,97

*, ** significativos a 5,0 e 1,0 % de probabilidade utilizando Tukey.

4.4 CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- Teores acima de 8 mM de nitrogênio interferem negativamente sobre o número e massa de nódulos.

- A magnitude da tolerância do processo de fixação biológica do nitrogênio ao aumento da disponibilidade de nitrogênio em solução é dependente da interação cultivar de soja/estirpe de *Bradyrhizobium*, indicando a possibilidade de selecionar interações mais resistentes a teores de nitrogênio, geralmente problemáticos, sem prejuízo a nodulação.

CAPÍTULO III

VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* RECUPERADAS DE SOLO SOB DIFERENTES MANEJOS

5.1 INTRODUÇÃO

O uso de estirpes recomendadas pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE) é uma obrigação legislativa, resultando em inoculações massivas com apenas quatro estirpes sobre os mesmos locais ao longo dos anos desde 1979 (Hungria et al., 2005; 2006a). As estirpes recomendadas atualmente para a produção de inoculantes comerciais para a soja no Brasil pertencem às espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) (Rumjanek et al., 1993; Lemos, 1994; Boddey & Hungria, 1995; Nishi et al., 1996; Sato et al., 1999; Bangel, 2000; Chueire et al., 2003).

As estirpes de rizóbio podem sofrer várias alterações em sua função simbiótica, que podem variar desde dificuldades para induzir a formação de nódulos até a redução na fixação do nitrogênio. Batista et al. (2007) descrevem a origem da variabilidade genética, obtida de *B. japonicum* e *B. elkanii* associados à soja no cerrado, sendo resultado de vários eventos combinados, tais como adaptação a condições adversas, recombinação genética e transferência horizontal de genes.

Adaptações aos solos, influenciadas por fatores bióticos e abióticos do ambiente, podem implicar em alterações das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas entre as estirpes de rizóbio, diferenciando-as geneticamente das estirpes parentais (Ferreira, 1999). O estudo da variabilidade dos rizóbios estabelecidos no solo auxilia no delineamento de estratégias para garantir o adequado suprimento de nitrogênio, exigido por cultivares de alta produtividade (Hungria et al., 2005; 2006a). A variabilidade genética das estirpes recomendadas para soja, após a introdução no solo sob diferentes agroecossistemas, bem como a sobrevivência e competitividade nestes sistemas, ainda é pouco conhecida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética das estirpes recomendadas para a cultura da soja, recuperadas de solo submetido a diferentes sistemas de manejo, e avaliar o efeito destes sistemas sobre a sobrevivência e competitividade das mesmas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local e amostragem

As plantas foram coletadas de uma área experimental localizada na Estação Experimental Agronômica da UFRGS em Eldorado do Sul, RS. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 1999). A área escolhida nunca havia sido cultivada, tendo sido mantida como campo nativo até o ano de 2000, quando se iniciou o experimento com cultivo de soja inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium*.

Os tratamentos envolveram métodos de preparo do solo (plantio direto e plantio convencional), adubação orgânica ou mineral, e duas utilizações do solo no inverno: consórcio aveia e ervilhaca como plantas de cobertura e ciclagem de nutrientes; ou cultivo de aveia ou trigo com a colheita dos grãos, conforme apresentado em Figura 1 do capítulo I. A adubação foi realizada nas dosagens recomendadas para correção da acidez e reposição de nutrientes, baseados em análise de solo de acordo com Comissão... (1995) (Apêndice 14). A fonte de adubo orgânico utilizado foi cama de aviário, cuja composição pode ser observada no Apêndice 2. A inoculação foi realizada utilizando-se inoculante turfoso (200g de inoculante para 50 kg de sementes), cedido pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), contendo em quantidades semelhantes as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080.

5.2.2 Isolamento dos rizóbios

Vinte nódulos foram coletados aleatoriamente de 10 plantas de cada tratamento. Os nódulos foram desinfestados e o isolamento foi realizado conforme procedimento padrão (Vincent, 1970). A purificação das culturas foi realizada por reinoculações em placas contendo meio sólido Levedura Manitol (LMA, Vincent, 1970) e verificação do período de crescimento, morfologia de

colônia, uniformidade de absorção do corante Vermelho Congo e teste de Gram. Os isolados foram inoculados em meio líquido LM e após a multiplicação, acondicionados refrigerados a -14°C em meio LM contendo 25% de glicerol. As culturas de trabalho foram mantidas em tubos com meio sólido LM inclinado a 4°C. Os isolados foram cultivados rotineiramente em meio líquido LM a 28°C com agitação constante de 65 rpm. Os isolados foram identificados com números que permitem relacioná-los aos tratamentos de campo em que foram coletados, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Identificação e origem dos isolados recuperados de solo sob diferentes tipos de manejo

Isolados	Tratamentos
11-12-13-14-18	PD - MIN IRRIG - GRÃO INV
21-24-25-26-27-28	PC - MIN IRRIG - GRÃO INV
32-33-34-35-36	PD - MIN IRRIG - COBERT. INV
41-43-45-46-47-48	PC - MIN IRRIG - COBERT. INV
51-53-54-55-56-57-58	PD - ORG - COBERT. INV
61-62-63-64-65-66-67-68	PC - ORG - COBERT. INV
72-73-74-76-77-78	PD - MIN - GRÃO INV
81-82-84-85-86-87-88	PC - MIN - GRÃO INV
91-92-93-94-95-96-98	PD - MIN - COBERT. INV
102-103-104-105-107	PC - MIN - COBERT. INV
111-112-113-115-116-117-118	PD - ORG - GRÃO INV
121-122-123-124-126-128	PC - ORG - GRÃO INV

PD – plantio direto; PC – plantio convencional; MIN – adubação mineral; ORG – adubação orgânica (cama de aviário); IRRIG – utilização de irrigação; GRÃO INV – utilização de aveia ou trigo no inverno com colheita dos grãos; COBERT. INV – utilização de consórcio de aveia e ervilhaca no inverno

5.2.3 Extração de DNA genômico

A extração do DNA das estirpes de *Bradyrhizobium* foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em 15 mL de meio líquido LM a 28°C sob agitação constante de 120 rpm durante sete dias. As células foram lavadas com tampão TES (Tris 50mM a pH 8,0; EDTA 0,5mM; NaCl 50mM), e ressuspendidas em EDTA salina (NaCl 150mM, EDTA 10mM a pH 8). A lise da célula foi realizada em SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% aquecido a 55°C. O DNA foi extraído com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e precipitado com etanol.

5.2.4 Perfis de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores

O DNA das estirpes foi comparado pela técnica de rep-PCR, baseada nas seqüências repetidas de ERIC e BOX. Os oligonucleotídeos iniciadores

ERIC1R e ERIC2 apresentam as seqüências 5'ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C3' e 5'AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G3' respectivamente; BOX A 1-R apresenta a seqüência 5'CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'.

A reação de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R foi realizada de acordo com o protocolo de Versalovic et al. (1991) sendo a reação de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador ERIC (ERIC 1R + ERIC 2) realizada de acordo com o protocolo de De Bruijn (1992). Para as amplificações do DNA foi utilizado como controle negativo das reações de PCR a água ultrapura. Utilizou-se a cada reação de amplificação as quatro estirpes recomendadas para a cultura da soja (SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

5.2.5 Análise de fragmentos amplificados por PCR

A separação dos fragmentos amplificados pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC1R e ERIC2 foi realizada em géis de agarose (1,5%) em cuba horizontal com tampão TBE (0,5X). A voltagem utilizada foi de 100 mV e tempo de migração de 60 minutos.

5.2.6 Análises genéticas

As análises para estimar a similaridade genética entre as estirpes utilizaram como informação básica as matrizes de presença (1) e ausência (0), construídas a partir do perfil de bandas obtido pela revelação dos géis de agarose para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Os agrupamentos foram realizados segundo o método de agrupamento UPGMA – [*Unweighted pair group with arithmetic mean* (Nei, 1987)] e coeficiente de Jaccard (Legendre & Legendre, 1983) para o cálculo da matriz de similaridade, com o auxílio do programa PAST – Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (Hammer et al., 2001). O índice de diversidade de Shannon (Shannon & Weaver, 1949) foi estimado baseado nos 79 isolados e no número de grupos formados, considerando 70% de similaridade (Alberston et al., 2006). O índice H foi calculado usando-se a fórmula $H = C/N (N \log N - \sum n_i \log n_i)$ (Atlas & Bartha, 1997), onde n_i corresponde ao número de grupos obtidos no dendrograma, N corresponde ao número total de isolados e C é uma constante que corresponde a 2,3.

5.2.7 Caracterização sorológica

Realizou-se a caracterização sorológica dos mesmos isolados descritos no item 5.2.2.

5.2.7.1 Produção de anti-soros

A produção dos anti-soros foi realizada no laboratório de microbiologia da FEPAGRO. Inicialmente, realizou-se a produção de antígenos com as estirpes originais representantes dos sorogrupos de bradirrizóbios que nodulam a cultura da soja. As estirpes foram cultivadas em meio triptona-levedura (Somasegaran & Hoben, 1994) constituída por triptona, extrato de levedura e cloreto de cálcio em concentração de 0,5; 3,0 e 0,87 g.L⁻¹, respectivamente. A solução com pH 7 foi esterilizada por autoclavagem por 20min, 120°C a 1,5 (atm). As culturas foram multiplicadas a 28°C, sob agitação constante (120rpm), até a concentração final de 1,0x10⁹ cel.mL⁻¹. Após, as bactérias foram centrifugadas (10.000 rpm, 30min a 4°C) e o precipitado lavado com solução salina (NaCl 0,85%) para a remoção de polissacarídeos extracelulares e de possíveis partes residuais do meio de cultivo. O precipitado foi ressuspenso no volume original de solução salina e armazenado a 4°C para posterior inoculação em coelhos para a produção de soros anti-células totais.

Utilizaram-se por antígeno dois coelhos, com aproximadamente quatro meses de vida. Empregando-se dois coelhos por antígeno, a fim de evitar variações ou perda por morte. A inoculação foi realizada via subcutânea, procedidas numa série de 12 aplicações, espaçadas por sete dias cada, num volume de 2mL (Alves & Lemos, 1996).

Após a série de inoculações, cada animal foi submetido à sangria pela veia marginal da orelha e o soro titulado por reação de aglutinação direta. Assim que foi obtido título superior a 1:1024, realizou-se a punção cardíaca nos animais. Os soros foram separados por centrifugação (10.000rpm por 10min a 4°C).

5.2.7.2 Tipificação dos *Bradyrhizobium* por soroaglutinação

Os isolados foram cultivados em meio líquido LM a 28°C com agitação constante (65 rpm). Após, realizou-se a centrifugação das células a 10.000rpm por 3min e a ressuspenso das mesmas em solução salina (NaCl 0,85%). Os

tubos contendo essa suspensão de células permaneceram em banho-maria a 100°C por 1 hora para inativação dos antígenos flagelares.

A reação de aglutinação ocorreu em placas de Takatsi, com fundo em “V” (Nishi et al., 1996). Em cada poço adicionou-se 50µL de suspensão antigênica e 50µL dos soros diluídos em solução salina e 20µL do corante cristal violeta 0,05% (em etanol) a cada 2mL da suspensão de células.

As placas foram agitadas por três minutos em agitador orbital, e em seguida deixados em repouso à temperatura ambiente por 24 horas para a manifestação da reação.

A presença de aglutinação foi indicada por sinal positivo e a ausência (resultados iguais ao controle negativo, representado por soro de animais não submetidos às inoculações) por sinal negativo após observação da placa em um negatoscópio com fundo branco.

5.2.8 Identificação da espécie de *Bradyrhizobium* por amplificação de seqüências do gene 16S RNAr

Foi utilizado o método baseado na técnica de PCR que permite diferenciar as espécies de *B. japonicum* e *B. elkanii* utilizando-se a amplificação de seqüências do gene 16S RNAr (Giongo et al., 2007). Essa técnica foi utilizada somente nos casos de dúvida em relação aos resultados obtidos pela caracterização sorológica.

O método utiliza uma trinca de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos. Um dos oligonucleotídeos iniciadores chamado Brady (5'AMTKCCTTTGAKWYTKAAGATCTTG3') é combinado com um dos oligonucleotídeos específico para o gênero *B. japonicum*, chamado Bjap (5'GTCACATCTCTGCGACCGGTC3') ou com o oligonucleotídeo iniciador específico pra o gênero *B. elkanii* chamado Belk (5'AACTCCGTCTCTGGAGTCCGCGA3'). A reação de amplificação (25µL) foi realizada contendo 5µL de DNA (20ng), 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen) tampão 1x, 2,5mM de MgCl₂, 5mM de dNTP e 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Brady combinado com Bjap ou Brady combinado com Belk) (Giongo et al., 2007). Para a amplificação foi realizado: uma desnaturação inicial de 1 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1min a 94°C para desnaturação inicial, 30s a 55°C para anelamento, 1min a 75°C para extensão, seguido por uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos da amplificação foram analisados

em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídeo (10mg ml^{-1}) em tampão TBE 1x, sendo fotografados sobre luz UV.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade genética dos bradirrizóbios isolados foi avaliada pelos perfis eletroforéticos obtidos da amplificação do DNA (Figura 1) utilizando dois grupos de oligonucleotídeos: BOX 1R; ERIC1-R e ERIC-2. Foi possível a identificação de grupos bem definidos dos isolados e das estirpes padrão. Setenta e cinco isolados recuperados do solo após 6 anos de inoculação, e quatro estirpes de referência foram analisados. O tamanho dos fragmentos obtidos variou entre 5.500 e 600 pb. Os perfis eletroforéticos foram convertidos em matrizes binárias e analisados pelo programa PAST (Hammer et al., 2001). As relações entre todos isolados estudados são apresentadas na Figura 1.

Apenas 25% dos isolados apresentaram alta similaridade com as estirpes parentais, 23% similares a *B. elkanii* e 2% similares a *B. japonicum*. Batista et al. (2007) encontrou menor percentual de isolados associados às estirpes parentais (6,4%), trabalhando com recuperação de estirpes de rizóbio associados à soja em solos do Cerrado.

Foram obtidos 10 grupos, a partir do ponto de corte em 70% de similaridade, além de nove isolados que apresentaram baixa similaridade com os demais, ficando separados dos grupos formados (Figura 1). A maior parte dos isolados (56%) localizou-se nos grupos I, II e III, os quais compreenderam 20, 11 e 13 isolados, respectivamente. As estirpes de referência pertencentes à espécie *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) localizaram-se no grupo I com similaridade de 83% entre si. Já as estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) apresentaram baixa similaridade (28%), tendo a estirpe SEMIA 5079 localizado-se junto ao grupo IX, enquanto SEMIA 5080 formou um grupo à parte.

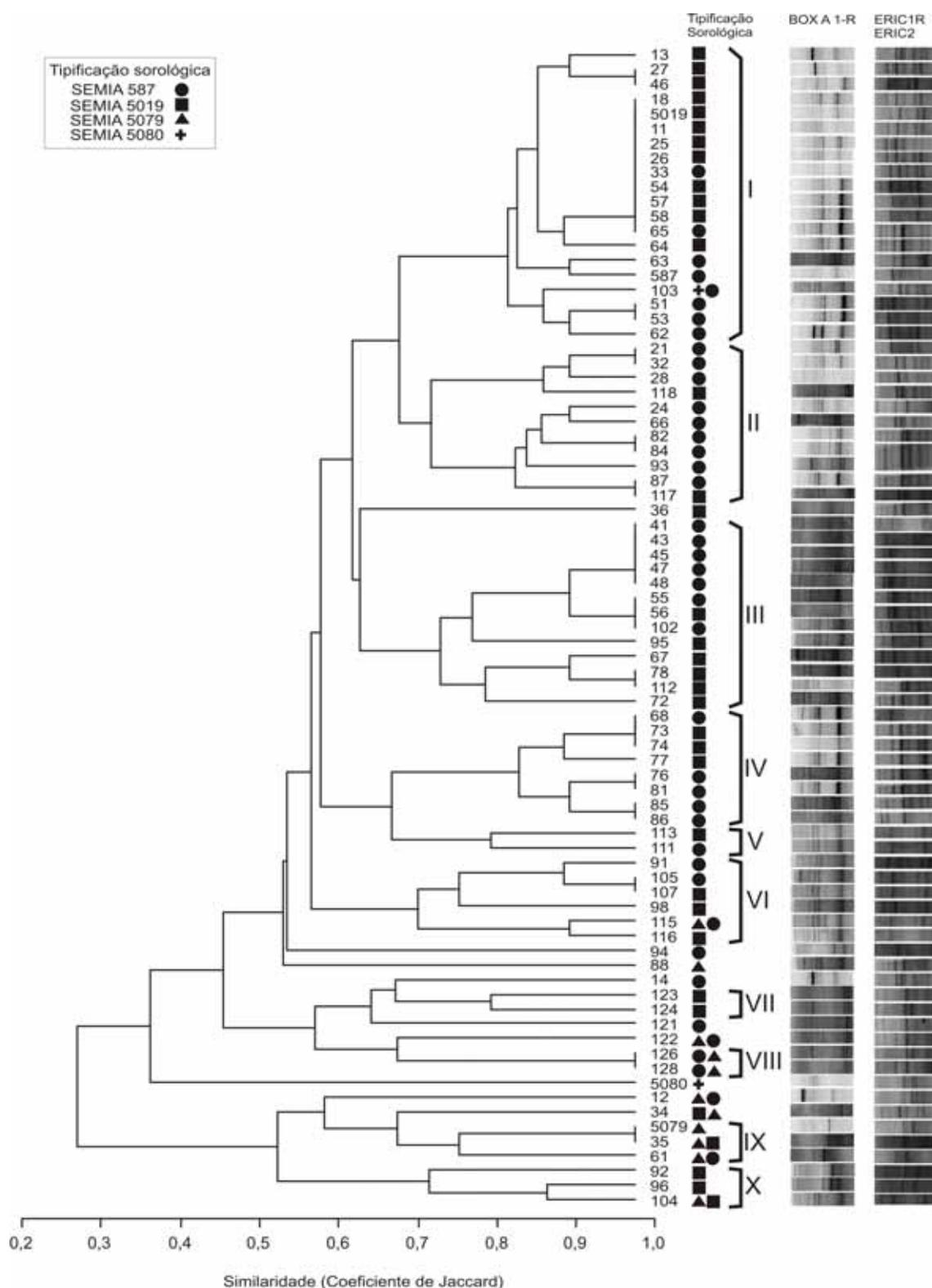


Figura 1. Dendrograma da variabilidade genética de *Bradyrhizobium* recuperados de solo sob diferentes sistemas de manejo, utilizando análise de clusters do produto do PCR obtido por ampliações do DNA com oligonucleotídeos BOX A 1R, ERIC1R e ERIC2 e tipificação sorológica das amostras.

Foi possível também identificar-se a associação entre a variabilidade genética e o tratamento de origem (Tabela 1). As amostras 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98 (tratamento sobre plantio direto, adubação mineral e utilização de aveia e ervilhaca no inverno) e 32, 33, 34, 35, 36 (tratamento sobre plantio direto, adubação mineral, irrigação e utilização de aveia e ervilhaca no inverno) destacaram-se por apresentar maior distribuição entre os grupos, indicando maior variabilidade genética. Por sua vez, as amostras 21, 24, 25, 26, 27, 28 (plantio convencional, adubação mineral e irrigação com uso de trigo ou aveia no inverno), 41, 43, 45, 46, 47, 48 (plantio convencional, adubação mineral e irrigação e utilização de aveia e ervilhaca no inverno) e 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58 (plantio direto, adubação orgânica e utilização de aveia e ervilhaca no inverno) destacam-se por apresentar menor distribuição entre os grupos, indicando menor variabilidade genética associada a esses tratamentos.

Alguns estudos sobre diversidade genética de populações indicam que atividades antropogênicas afetam a diversidade microbiana (Caballero-Mellado & Martinez-Romero, 1999; Zahran, 1999; Giongo et al., 2008) e manejo do solo e culturas podem afetar a biomassa e atividade microbiana (Hungria & Vargas, 2000; Vargas & Scholles, 2000; Franchini et al., 2007).

O índice de Shannon foi calculado para verificar a diversidade genética entre os isolados a partir dos grupos formados no dendrograma (Figura 1). O resultado revelou um alto índice de diversidade entre os isolados, obtido a partir de 79 isolados ($H = 5,46$). Foram também obtidos índices de diversidade genética isolando-se os tratamentos. Assim, o PD ($H = 4,84$) foi superior ao PC ($H = 4,55$), a adubação mineral ($H = 4,33$) superior a adubação orgânica ($H = 4,12$) e o uso de cobertura aveia e ervilhaca no inverno ($H = 4,08$) inferior ao uso de trigo ou aveia para obtenção de grãos no inverno ($H = 4,92$). Os índices de diversidade de Shannon são altamente variáveis de local para local em virtude das variações de organismos e ambientes, a título de exemplo resultados similares foram obtidos por Giongo et al. (2008) que trabalharam com rizóbios que nodulam soja em cinco regiões do Rio Grande do Sul e encontraram índices de diversidade que variam de $H = 3,95$ a $H = 6,17$. Vargas et al. (2007) encontrou um $H = 4,30$ ao estudar a diversidade genética de rizóbios que nodulam *Acacia mearnsii* no Rio Grande do Sul. Andrade et al. (2002) encontraram valores menores de diversidade ($H = 3,93$) ao analisar

rizóbios associados ao feijoeiro em solos ácidos, corrigidos com calcário. Estudos mostram que a diversidade é geralmente menor em comunidades sob estresse ambiental (Atlas et al., 1991; Hungria et al., 2006b), o que foi observado na comparação entre o tratamento PD e o PC.

A caracterização sorológica (Figura 1) mostrou ampla predominância da espécie *B. elkanii* (92% dos isolados), sendo 48% de SEMIA 587 e 44% de SEMIA 5019. Enquanto que para *B. japonicum* observou-se 12% de SEMIA 5079 e 1% de SEMIA 5080. Estes resultados indicam que as estirpes pertencentes à espécie *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) são mais competitivas e que a baixa ocupação nodular das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) determinam menor sobrevivência destas neste ambiente. Não se observou presença predominante de algum grupo sorológico associada a algum tratamento. A tipificação sorológica permitiu a identificação de 87% dos isolados ao nível de estirpe. O uso de anticorpos policlonais em reações de aglutinação somática tem como principal limitação a possibilidade de reações cruzadas (Thies et al., 2001). Os isolados 12, 34, 35, 61, 103, 104, 115, 122, 126 e 128 apresentaram reação cruzada, gerando dúvidas em relação à origem destes isolados. Para esses dez isolados, utilizou-se a técnica baseada nas seqüências do gene RNAr 16S (Giongo et al., 2007), que permitiu identificá-los como pertencentes à espécie *B. elkanii* ou *B. japonicum* (Tabela 2). Os dados apresentados na Tabela 2 são os primeiros resultados obtidos com esta técnica de diferenciação de *B. japonicum* e *B. elkanii* (Giongo et al., 2007), o protocolo é simples e confiável, o que possibilita a aplicação em laboratórios de rotina de análise de rizóbios.

A predominância de estirpes de *B. elkanii* na ocupação nodular, independente dos tratamentos submetidos, também foi observada por Bizarro (2004). Segundo Triplett & Sadowsky (1992), muitos casos de insucessos na nodulação são atribuídos à baixa competitividade das estirpes de bactérias inoculadas, que não são capazes de prevalecer nos nódulos do hospedeiro, sobretudo quando o solo apresenta condições físicas e químicas desfavoráveis.

Tabela 2. Diferenciação de *B. elkani* e *B. japonicum* utilizando seqüências do gene RNAr 16S amplificadas com trincas de oligonucleotídeos específicos para cada espécie

Isolados	Caracterização sorológica	Diferenciação de <i>B. elkani</i> e <i>B. japonicum</i> ¹
SEMIA 587	SEMIA 587	<i>B. elkani</i>
SEMIA 5019	SEMIA 5019	<i>B. elkani</i>
SEMIA 5079	SEMIA 5079	<i>B. japonicum</i>
SEMIA 5080	SEMIA 5080	<i>B. japonicum</i>
12	SEMIA 5079/SEMIA 587	<i>B. japonicum</i>
34	SEMIA 5019/SEMIA 5079	<i>B. elkani</i>
35	SEMIA 5079/SEMIA 5019	<i>B. japonicum</i>
61	SEMIA 5079/SEMIA 587	<i>B. japonicum</i>
103	SEMIA 5080/SEMIA 587	<i>B. elkani</i>
104	SEMIA 5079/SEMIA 5019	<i>B. elkani</i>
115	SEMIA 5079/SEMIA 587	<i>B. elkani</i>
122	SEMIA 5079/SEMIA 587	<i>B. elkani</i>
126	SEMIA 587/SEMIA 5079	<i>B. elkani</i>
128	SEMIA 587/SEMIA 5079	<i>B. elkani</i>

¹ Método descrito por Giongo et al. (2007)

5.4 CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- A variabilidade genética foi maior no plantio direto do que no plantio convencional, maior na adubação mineral do que na adubação orgânica, da mesma forma foi maior nas culturas de inverno trigo ou aveia do que aveia e ervilhaca.
- Independente dos manejos testados as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) foram mais competitivas que *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAO, S.; KOUCHI, H. A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. **Soil Science and Plant Nutrition**, Ibaraki, v.38, n.1, p.183-188, 1992.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. . **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.38, n.1, p.1298-1307, 2006.

ALVAREZ, R. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from tree tillage systems. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v.33, n.1, p.17-28, 1995.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Netherlands, v.252, n.1, p.1-9, 2003.

ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Use of lipopolysaccharide for immunological characterization of *Bradyrhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, n.9, p.1227-1234, 1996.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculante por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-SPI, Brasília. 1994. p.63-92.

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.34, n.4, p.477-485, 2002.

ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, London, v.24, n.1, p.1-7, 2000.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and applications**. Menlo Park: Addison Wesley Longman, 1997. 694 p.

ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M. I.; BEJ, A. K. Response of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, Oxford, v.22, n.1, p.249-256, 1991.

AUSMEES, N.; KOBAYASHI, H.; DEAKIN, W. J.; MARIE, C.; KRISHNAN, H. B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.186, n.3, p.4774-4780, 2004.

BANGEL, E. V. **Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. f. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.

BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* Seven Years after Introduction of both the Exotic Microsymbiont and the Soybean Host in a Cerrados Soil. **Microbial Ecology**, Springer, v.53, n.2, p.270-284, 2007.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, n.1, p.105-112, 1997.

BHAGWAT, A. A.; KEISTER, D. L. Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.1, p.3496-3501, 1991.

BIZARRO, M. J. **Inoculação de soja em solo submetido a diferentes sistemas de manejo**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado)

Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

BLEVINS, R. L. Influence of no-tillage and nitrogen fertilization on certain soil properties after 5 years of continuous corn. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, n.1, 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., et al., eds. **Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI**. IAPAR/Embrapa-CNPSO, Londrina. 1995. p.332-339.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Porto Alegre, v.33, p.937-953, 1998.

BOOTE, K. J. Effect of foliar fertilization on photosynthesis, leaf nutrition and yield of soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, n.7, 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, n.2, 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. 119 f. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1986.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, n.1, p.143-180, 1995.

BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotecnology**, New York, v.22, n.3, p.381-393, 1999.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. **Symbiosis**, Israel, v.26, n.1, p.111-121, 1999.

CÂMARA, G. M. S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G. M. S., ed. **Soja: tecnologia de produção**, Piracicaba. 1998. p.278-293.

CARROLL, B. J. A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. **Plant Physiology**, Melbourne, v.78, n.1, p.34-40, 1985.

CARVALHO, F. G.; SELBACH, P. A.; BIZARRO, M. J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.29, n.6, p.883-891, 2005.

CHALK, P. M. Integrated effects of mineral nutrition on legume performance. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v.32, n.1, p.577-579, 2000.

CHO, M. J.; HARPER, J. E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentrations in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiology**, Melbourne, v.95, n.1, p.435-441, 1991.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.27, n.1, p.833-840, 2003.

COMISSÃO... **Recomendação de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Passo Fundo: 3 ed. 1995. 224 p.

DA ROS, C. **Dinâmica do carbono e do nitrogênio com o uso de uréia na sucessão aveia preta/milho no sistema plantio direto**. 2004. 156 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2004.

DALE, P. J. The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: general considerations. **Molecular Ecology**, Cambridge, v.3, n.1, p.31-36, 1994.

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, n.1, p.45-56, 1970.

DAZZO, F. B.; BRILL, W. J. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. **Plant Physiology**, Madison, v.62, n.1, p.18-21, 1978.

DE AANTONI, G.; LOPARDO, H.; GRAU, O. Interference in culture among *Rhizobium* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, n.1, p.409-415, 1981.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.58, n.1, p.2180-2187, 1992.

DELORIT, R. J.; GUNN, C. R. **Seeds of continental United States legumes (Fabaceae)**. Park Falls. 1986.

DERPSCH, R. **Controle da erosão no Paraná, Brasil: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo**. Eschborn: GTZ. 1991. 228 p.

DIAZ, C. L.; MELCHERS, L. S.; HOOYKAAS, P. J. J. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Nature**, London, v.338, n.1, p.579-581, 1989.

DIEKOW, J. **Antecipação da adubação nitrogenada em milho cultivado no sistema plantio direto, em sucessão à aveia preta**. 2000. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.

DUODU, S.; BHUVANESWARI, T.V.; STOKKERMANS, T.J.W.; PETERS, N.K. A positive role for rhizobitoxine in *Rhizobium*-legume symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v.12, n.1, p.1082-1089, 1999.

EARDLY, B. D.; YOUNG, J. P. W.; SELANDER, R. K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Cambridge, v.58, n.1, p.1809-1815, 1992.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil - 1993/1994**. Londrina: Embrapa-CNPSo. 1993. 120 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa. 1999. 412 p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2003**. Londrina: Embrapa-CNPSo. 2002. 199 p.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASSOROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FAO. **Legume inoculation and their use**. Rome. 1984. 63 p.

FERREIRA, M. C. **Biodiversidade de *Bradyrhizobium* capaz de nodular a soja em solos brasileiros**. 1999. 47 f. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1999.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.79, n.2, p.139-152, 2002.

FERREIRA, M. C.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; TAKEMURA, S. M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, v.32, n.1, p.627-637, 2000.

FRANCHINI, J. C.; TORRES, E.; SOUZA, R. A.; CRISPINO, C. C.; SOUZA, L. J.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in Southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, New York, v.92, n.1, p.18-29, 2007.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press. 1932. 343 p.

FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa. In: CARDOSO, E. J. B. N. T., S. M.; NEVES, M. C. P., ed. **Microbiologia do Solo**. SBCS, Campinas. 1992. p.121-140.

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**. Ministério de Agricultura, Rio de Janeiro. 1971. p.211-247.

GALLETI, P. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Rio de Janeiro, v.6, n.1, p.1-8, 1971.

GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.19, n.1, p.933-939, 2003.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. Wallingford: UK:CAB. 1993. 313 p.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; FREIRE, J. R. J.; ZANETTINI, M. H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Amplification of 16S rRNA gene sequences to differentiate two highly related bradyrhizobia species. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1361-1364, 2007.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R. J.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, Baltimore, v.38, n.3, p.261-269, 2008.

GOMES, P. **A soja**. São Paulo: Nobel: 5 ed. 1990. 152 p.

GONZÁLEZ, J.E.; MARKETON, M.M. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.67, n.4, p. 574-592, 2003,

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTIN, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. 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, n.2, p.198-207, 1994.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v.36, n.1, p.1389-1398, 2004.

GREMAUD, M. F.; HARPER, J. E. Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. **Plant Physiology**, Baltimore, v.89, n.1, p.169-173, 1989.

GRESSHOFF, P. M. Post-genomic insights into nodulation. **Journal of General Biology**, Moskva, v.4, n.1, p.201, 2003.

GUERIN, V. Proteolysis and nitrogen fixation in faba-bean (*Vicia faba*) nodules under water stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, n.1, 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, n.1, p.195-205, 1997.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g-1 root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant and Soil**, v.198, n.1, p.127-136, 1998.

GUO, R. 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, n.5, p.501-508, 1992.

HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, New York, v.1, n.1, p.55-63, 1992.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Acesso em: 13/05/2008.

HARDARSON, G. Measurements of nitrogen fixation in favabean at different N fertiliser rates using the ¹⁵N isotope dilution and A-value methods. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.131, n.2, 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, n.3, p.229-236, 1979.

HARRISON, S. P.; MYTTON, L. R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v.38, n.1, p.1009-1015, 1992.

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, n.1, p.753-760, 1986.

HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, London, v.3, n.1, p.545-548, 2001.

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, n.1, p.1639-1643, 1990.

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, n.2, p.215-222, 1981.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins: 9 ed. 1994. 76-170 p.

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, n.12, 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, n.1, p.475-478, 1985.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effect of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, n.1, 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, n.1, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. **Field Crops Research**, v.65, n.1, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soil**, London, v.3145-52, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T. H., M., ed. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Embrapa-CPAC, Planaltina. 1997. p.189-295.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E., eds. **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**, Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 2005. p.25-42.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R. P., et al., eds. **Focus on plant agriculture: 1. nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Studium Press, LLC, Houston. 2006a. p.43-93.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, New York, v.288, n.2, p.343-356, 2006b.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, Osaka, v.21, n.1, p.561-568, 2001.

IMSANDE, J. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, London, v.37, n.1, p.348-355, 1986.

JORDAN, D. 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**, v.32, n.2, p.136-139, 1982.

JORDAN, D. C. Family III Rhizobiaceae CONN 1938, 321AL. In: KRIEG, N. R. H., J. G. , ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Willian and Wilkins, Baltimore. 1984. p.235-244.

KAHINDI, J. H. P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; KARANJA, N. K.; GILLER, K. E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Baltimore, n.6, p.55-76, 1997.

KALITA, M.; STÉPKOWSKI, T.; ZOTOCKA, B.; MALEK, W. 2006. Phylogeny of nodulation genes and symbiotic properties fo *Genista tinctoria* bradyrhizobia, pp. 10/03/08. DOI 10.1007/s00203-006-0124-6 Archives of Microbiology.

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 and Soil**, Dodrecht, v.112, n.1, p.15-22, 1988.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, New York, v.32, n.1, p.210-220, 2006.

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, n.1, p.253-267, 1981.

KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium, and phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.43, n.5, p.519-523, 1979.

KUYKENDALL, L. D.; ROY, M. A.; O'NEILL, J. J.; DEVINE, T. E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.3, p.358-361, 1988.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.5, p.501-505, 1992.

LABES, G.; ULRICH, A.; LENTZSCH, P. Influence of bovine slurry deposition on the structure of nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* soil populations in a natural habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.62, n.1, p.1717-1722, 1996.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragments length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.60, n.1, p.58-63, 1994.

LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. **ENCONTRO LATINOAMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE-Anais...** IAPAR, Ponto Grosso. 1993. p.29-62.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. **Numerical ecology**. New York: Elsevier. 1983. 419 p.

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**. 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, n.1, 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, n.1, p.1405-1411, 1999.

LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agronomy Research**, New York, v.20, n.5, p.543-556, 1921.

LÓPEZ-GARCÍA, S. L.; VASQUÉS, T. E. E.; FAVELUKES, G.; LODEIRO, A. R. Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.183, n.3, p.7241-7252, 2002.

LOWENDORFF, H. S. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.4, n.1, p.87-124, 1981.

LUNGE, V. R. **Identificação e análise filogenética entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* por RFLP e RAPD**. 1993. 112 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1993.

MADRZAK, C. J.; GOLINSKA, B.; KROLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, D.; SADOWSKY, M. J. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.61, p.1194-1200, 1995.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soil**, Heidelberg, v.38, n.3, p.333-339, 2003.

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, n.1, p.2493-2498, 1989.

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, n.1, p.81-89, 1990.

MINANISAWA, 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, n.1, p.1-9, 1991.

MONTAÑES, A. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Applied Soil Ecology**, New York, n.2, p.165-174, 1995.

MONTAÑES, A. 2000. **Overview and case studies on biological nitrogen fixation: perspectives and limitations**. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aql/agll/soilbiod/cases/caseb1.pdf>. Acesso em: Acesso em 11/03/08.

MOROTE, C. G. B.; VIDOR, C.; MENDES, N. G.; PEREIRA, J. S. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, n.1, p.143-150, 1990.

MUNÉVAR, F.; WOLLUM LL, 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, n.11, p.1113-1120, 1981.

MUNNS, D. N. Soil acidity and related factors. In: VINCENT, J. M., ed. **Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture**. University of Hawaii. College Tropical Agriculture, Hawaii. 1977. p.211-236.

MUZZILI, O.; VIEIRA, M. J.; ALMEIDA, F. L. S. Comportamento e possibilidades da cultura do milho em plantio direto no Estado do Paraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.18, n.1, p.41-47, 1983.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press. 1987. 512 p.

NISHI, C. Y. M.; BODDEY, L. H.; VARGAS, A. 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, n.1, p.147-62, 1996.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume bacteriology. In: SHAW, N. H. B., W. W., ed. **Tropical pasture research: principles and methods**. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crop, Hurley. 1976. p.134-174.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Minireview: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v.37, n.1, p.1661-1669, 1999.

PANKHURST, C. E.; SPRENT, J. I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybean

and field bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.1, p.1-9, 1976.

PAVAN, M. A. Chemical and mineralogical characteristics of selected acid soils of the State of Paraná, Brazil. **Turrialba**, Londrina, v.35, n.1, 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, n.1, p.139-143, 1980.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of nifH gene. **Research in Microbiology**, Oxford, v.152, n.1, p.95-103, 2001.

POOLE, W. D. Foliar fertilisation of soybean. Effect of fertiliser sources, rates and frequency of application. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, n.2, 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, n.1, p.713-721, 1981.

RAMOS, M. L. G. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, n.1, p.145-150, 1993.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M. F.; FERREIRA, A. C.; REIS, F. B.; RIBEIRO, J. R. A.; SALLES, J. F.; WEBER, O. B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa CNPAB. 1997. 11 p.

RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. K.; LUPATINI, G. C.; SANTOS, E. J. S. Modificações em atributos químicos do solo arenoso sob sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, n.1, p.713-721, 1998.

ROUGHLEY, R. J. Environmental and cultural aspects of the management of legumes and *Rhizobium*. **ADVANCES in legume sciences**. Royal Botanic Gardens, Kew. 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, n.43, 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**. Horizon Scientific Press, Madison. 2000. p.279-293.

SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. The changing face of rhizobial systematics. **Current Science**, v.84, n.1, p.43-48, 2003.

SALET, R. L. **Dinâmica de íons na solução de um solo submetido a diferentes sistemas de manejo**. 1994. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1994.

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, n.3, p.387-391, 1999.

SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnology Advances**, Elmsford, v.13, n.1, p.75-90, 1995.

SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.12, n.1, p.163-174, 1996.

SELBACH, P. A. **Efeito da incorporação de cobertura vegetal sobre o nitrogênio inorgânico e sobre a população microbiana do solo e sua interação 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.

SELENSKA-POBELL, S. Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: ACKERMANS, A. D. L., VAN ELSAS, J.D., DE BRUIJN, F.D., ed. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic, Dordrech. 1995. p.1-17.

SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprint. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.80, n.1, p.517-528, 1996.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Evidence that carbon dioxide enrichment alleviates ureide-induced decline of nodule nitrogenase activity. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, n.1, p.85-89, 2003.

SHANNON, C. E.; WEAVER, R. W. **The mathematical theory of communication**. Illinois: University of Illinois Press. 1949.

SIKORA, S.; DEDZEPOVIC, S.; BRADIC, M. M. R.-. Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. **Microbiological Research**, Dordrecht, v.157, n.1, p.213-219, 2002.

SIMON, T.; KÁLALOVÁ, S.; PETRZIK, K. Identification of Rhizobium strains and evaluation of their competitiveness. **Folia Microbio**, Prague, v.41, n.1, p.65-72, 1996.

SINCLAIR, T. R.; PURCELL, L. C.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; KING, C. A.; NELSON, R. Identification of soybean genotypes with N₂ fixation tolerance to water deficits. **Crop Science**, Madison, v.40, n.6, p.1803-1809, 2001.

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, n.1, p.1957-1962, 1989.

SOLOMON, J. M.; GROSSMAN, A. D. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. **Trends in genetics**, London, v.12, n.4, p.150-155, 1996.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia**. New York: Springer-Verlag. 1994. 450 p.

SPRENT, J. I. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. In: NUTMAN, P. S., ed. **Simbiotic nitrogen fixation**. University Press, Cambridge. 1976. p.405-420.

STALEY, T. E. Soil microbial biomass and organic component alterations in a no-tillage chronosequence. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.52, n.1, p.998-1005, 1988.

STAMFORD, N. 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, n.1, 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, n.2, p.148-154, 1985.

STOUGAARD, J. Regulators and regulation of legume root nodule development. **Plant Physiology**, v.124, n.1, p.531-540, 2000.

STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v.7, n.1, p.1-23, 1988.

SVENNING, M. M. 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, n.1, p.729-738, 1996.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed: 3 ed. 2004. 719 p.

THOMAS, C. M.; NIELSEN. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews/Microbiology**, London, v.3, n.9, p.711-721, 2005.

TRINICK, M. J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J. M., ed. **Nitrogen fixation in legumes**. Academic Press, Sydney. 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, n.1, p.335-342, 1987.

TRIPLETT, E. W.; SADOWSKY, M. J. Genetics of competition for nodulation. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v.46, n.1, p.399-428, 1992.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. **Journal of Bacteriology**, London, v.177, n.1, p.468-472, 1995.

VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.1, p.3835-3841, 1990.

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, n.1, 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, n.1, p.91-101, 1988.

VARGAS, L. K. **Composição da comunidade microbiana do solo e sua relação com a disponibilidade de nitrogênio para a cultura do milho**. 2002. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um solo Podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.1, p.35-42, 2000.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. A. Genetic diversity and symbiotic efficiency of black wattle nodulating rhizobia from soils from Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, n.4, p.647-654, 2007.

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 dos cerrados**. Embrapa-CPAC, Planaltina. 1997. p.297-360.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília: EMBRAPA-SPI. 1994. 83 p.

VENKATESWARLU, B. Effects of water deficit on N₂(C₂H₂) fixation in cowpea and groundnut. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.114, n.1, p.69-74, 1989.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n.1, p.6823-9831, 1991.

VESPER, S. J.; BAUER, W. D. Characterization of Rhizobium attachment to soybean roots. **Symbiosis**, 1985, v.1, n.1, p.139-162, 1985.

VIDOR, C. Symbiotic dinitrogen fixation. In: RUSSEL, R. S. E. A., ed. **The soil/root system in relation to Brazilian agriculture**. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná/IAPAR, Londrina. 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, n.1, p.227-238, 1979.

VINCENT, J. M. **Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell. 1970. 164 p.

VINCENT, J. M. Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. In: NEWTON, W. E. O.-J., W. H. , ed. **Nitrogen Fixation: Vol II. Symbiotic Associations and Cyanobacteria**. MD: University Park Press, Baltimore. 1980. p.103-129.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KLUPER, M.; ZABEAU, M.-. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, n.1, p.4407-4414, 1995.

VOSS, M.; SIDIRAS, N. Nodulação da soja em plantio direto em comparação com plantio convencional. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.20, n.7, 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, n.4, p.451-458, 1986.

WANG, S. P.; STACEY, G. Ammonia regulation of nod genes in Bradyrhizobium japonicum. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.223, n.1, p.329-331, 1990.

WATSON, R. J.; HAITAS-CROCKETT, C.; MARTIN, T.; HEYS, R. Detection of Rhizobium meliloti cells in field soil and nodules by polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v.41, n.1, p.815-825, 1995.

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, n.1, p.229-232, 1974.

WEBER, M. Evolutionary plasticity in prokaryotes: A oabgkissian view. **Biology and Philosophy**, New York, v.11, n.1, p.67-88, 1996.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, London, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, n.1, p.3-14, 2006.

WOJTASZEK, P. 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, n.1, p.698-694, 1993.

YUHASHI, K.; ICHIKAWA, N.; EZURA, H.; AKAO, S.; MINAKAWA, Y.; NUKUI, N.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.66, n.1, p.2658-2663, 2000.

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, New York, v.63, n.9, p.968-989, 1999.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A inoculação da soja a campo, realizada no terceiro cultivo sobre a mesma área, continuou apresentando aumento de massa e número de nódulos com reflexos na massa da parte aérea e no teor de nitrogênio nas plantas. Isto ficou mais evidenciado no tratamento onde foi utilizado o plantio direto, que, pelas observações efetuadas, reuniu as melhores condições para o processo de fixação biológica do nitrogênio. O aumento dos teores de nitrogênio mineral do solo prejudicou o processo de fixação biológica evidenciado pela redução da massa de nódulos. Entretanto, foi possível identificar interações entre estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de soja mais tolerantes aos teores de nitrogênio mineral em termos de número e massa de nódulos. Sendo a cultivar mais resistente a BRS Torena e as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. As técnicas de biologia molecular e a identificação sorológica utilizadas permitiram identificar quais estirpes estão ocorrendo no experimento de campo e quais os efeitos do manejo do solo sobre a variabilidade genética dos isolados. Observou-se maior variabilidade genética no plantio direto do que no plantio convencional, maior na adubação mineral, do que na adubação orgânica. Fato semelhante foi observado no cultivo de trigo ou aveia comparado com aveia e ervilhaca. Dentre as estirpes utilizadas, SEMIA 587 e SEMIA 5019, apresentaram uma ocupação nodular de 92%, caracterizando-as como mais competitivas.

8. 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 em outubro/2004

Tratamento		pH	Al _{troç.} ----- cmol _c L ⁻¹ -----	Ca _{troç.}	Mg _{troç.}	M.O. %	P ----- mg L ⁻¹ -----	K
Adubação Mineral Irrigado								
Bloco I	PD	6,3	0,0	5,2	2,4	2,7	7,0	188
	PC	6,0	0,0	4,4	2,1	2,7	8,2	195
Bloco II	PD	6,2	0,0	5,5	2,4	3,2	11,5	216
	PC	5,7	0,0	3,6	1,8	2,7	4,7	222
Adubação Mineral								
Bloco V	PD	6,4	0,0	5,3	2,4	3,3	10	184
	PC	5,8	0,0	3,6	1,9	2,6	5,8	209
Bloco VI	PD	6,3	0,0	4,2	2,3	3,8	6,0	233
	PC	5,8	0,0	3,4	1,7	2,6	4,3	206
Adubação Orgânica								
Bloco IV	PD	6,0	0,0	5,8	1,8	3,6	42	245
	PC	5,9	0,0	4,8	1,6	2,9	23	283
Bloco VIII	PD	6,3	0,0	5,8	1,7	3,6	39	257
	PC	6,0	0,0	4,8	1,4	3,0	23	241
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 - %	30,0
Nitrogênio - %	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	61,0
Zinco total - mg kg ⁻¹	454,0
Ferro total - %	0,11
Manganês total - mg kg ⁻¹	448,0
Sódio total - %	0,76
Boro total - mg kg ⁻¹	17,0

Resultados expressos em material seco a 75°C.

Apêndice 3. Valores do teste F para número de nódulos e massa de nódulos avaliados nos estádios do quinto nó e início do florescimento das plantas de soja

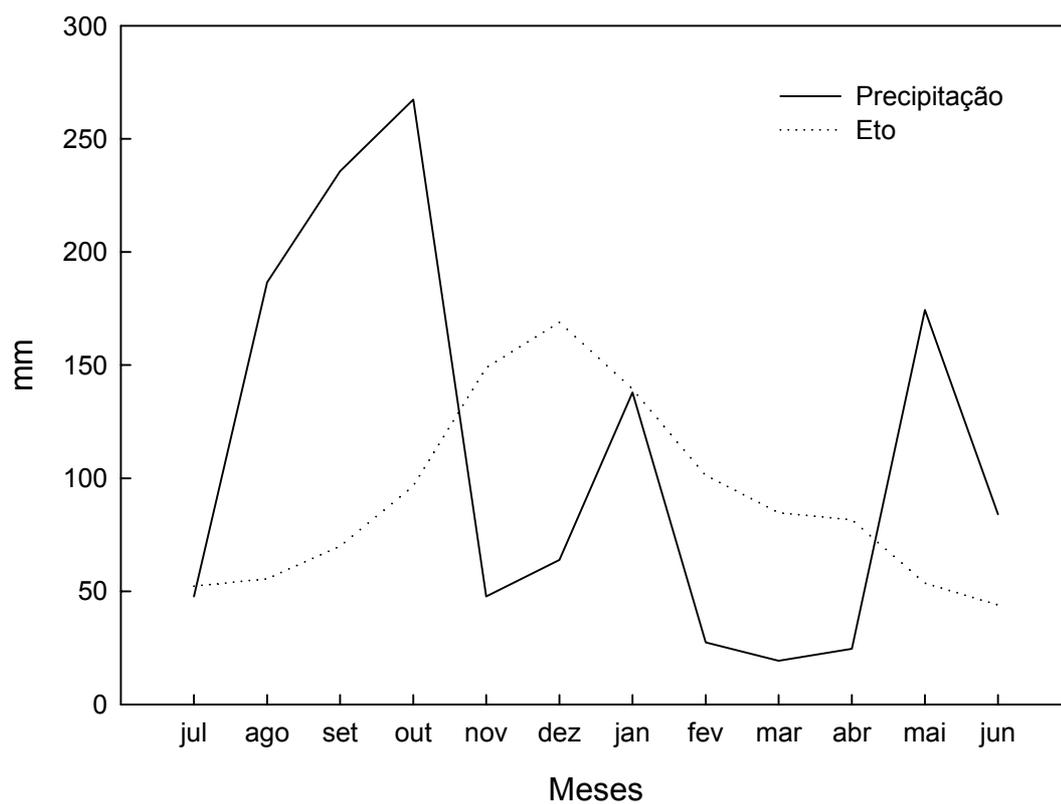
Causas da variação	GL	Nº nódulos		Massa de nódulos	
		V5 ¹	R1 ²	V5	R1
Adubação (A)	1	5,88*	4,56*	1,12 ^{ns}	2,09 ^{ns}
Preparo do solo (B)	1	55,24***	3,15 ^{ns}	58,04***	29,75***
Inoculação (C)	1	1,26 ^{ns}	0,27 ^{ns}	3,24 ^{ns}	16,52***
A x B	1	3,78 ^{ns}	0,73 ^{ns}	7,06*	1,34 ^{ns}
B x C	1	0,12 ^{ns}	3,17 ^{ns}	1,12 ^{ns}	3,64 ^{ns}
A x C	1	0,01 ^{ns}	1,65 ^{ns}	2,87 ^{ns}	3,79 ^{ns}
A x B x C	1	0,42 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,10 ^{ns}	1,42 ^{ns}
Resíduo	40				
CV (%)		24,62	27,58	29,12	18,50

*, **, *** significativo ao nível de 5%, 1% e <1%; ns - não significativo
¹ estádio do quinto nó; ² estádio do início do florescimento

Apêndice 4. Valores do teste F para massa da parte aérea e nitrogênio total do tecido avaliado nos estádios do quinto nó e início do florescimento das plantas de soja

Causas da variação	GL	Massa da Parte Aérea		N total do tecido	
		V5 ¹	R1 ²	V5	R1
Adubação (A)	1	11,85**	6,53*	12,04**	25,47***
Preparo do solo (B)	1	0,03 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,61 ^{ns}	10,61**
Inoculação (C)	1	5,55*	18,59***	10,18**	49,01***
A x B	1	16,86***	3,98 ^{ns}	10,61**	0,73 ^{ns}
B x C	1	0,71 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,99 ^{ns}	1,78 ^{ns}
A x C	1	3,28 ^{ns}	0,31 ^{ns}	2,56 ^{ns}	0,64 ^{ns}
A x B x C	1	1,93 ^{ns}	1,35 ^{ns}	2,45 ^{ns}	0,76 ^{ns}
Resíduo	16				
CV (%)		15,25	19,90	18,73	13,10

*, **, *** significativo ao nível de 5%, 1% e <1%; ns - não significativo
¹ estádio do quinto nó; ² estádio do início do florescimento



Apêndice 5. Precipitação e ETo-evapotranspiração de referência determinados no período de julho a junho do ano agrícola 2005/2006. ETo calculada pela equação de Penman

Apêndice 6. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes cultivares, estirpes de *Bradyrhizobium*, avaliadas na ausência de nitrogênio.

Cultivar	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
RS 10	25.99 b	51.94 a	8.29 b	21.31 c	116.54 a	115.14 bc	20.26 c	83.58 b	2.20 b	2.53 b	1.67 b	2.73 b
CD 208	54.76 a	55.78 a	16.36 b	11.27 d	91.07 ab	96.70 c	42.84 bc	23.74 c	3.30 a	3.07 b	3.67 a	5.50 a
BRS Torená	71.96 a	58.62 a	50.87 a	39.59 b	126.43 a	200.80 a	119.07 a	95.14 b	3.60 a	4.47 a	3.83 a	2.07 bc
CD 208	34.66 b	52.62 a	40.41 a	59.49 a	67.43 b	156.63 ab	56.78 b	153.43 a	1.03 c	1.43 c	1.07 b	1.70 c

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 7. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes cultivares, estirpes de *Bradyrhizobium*, submetidas a 8mM de nitrogênio.

Cultivar	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
RS 10	12.58 c	13.95 c	11.95 c	0.94 b	43.14 b	38.10 c	41.92 b	1.09 c	3.00 c	2.73 c	4.20 ab	2.63 c
CD 208	45.05 b	63.95 a	25.44 b	15.31 a	155.04 a	189.21 a	42.31 b	39.40 b	5.33 a	5.07 a	4.60 a	5.17 a
BRS Torená	72.23 a	49.30 ab	39.91 a	23.33 a	153.07 a	102.61 b	115.50 a	69.64 ab	5.37 a	3.83 b	4.27 ab	3.90 b
CD 208	54.96 ab	42.21 b	14.22 c	15.86 a	120.65 a	162.15 a	55.95 b	107.84 a	4.33 b	3.60 bc	3.40 b	2.53 c

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 8. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes cultivares, estirpes de *Bradyrhizobium*, submetidas a 16mM de nitrogênio.

Cultivar	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
RS 10	26.65 b	33.51 a	0.00 b	0.00 b	49.68 a	57.20 b	0.00 c	0.00 b	2.87 b	3.17 b	2.90 c	2.17 c
CD 208	49.76 a	16.09 b	27.45 a	6.45 a	54.86 a	44.73 b	73.41 a	15.80 a	3.53 ab	5.50 a	7.43 a	6.63 a
BRS Torená	0.64 c	40.59 a	26.66 a	4.36 a	1.95 b	98.67 a	11.70 b	1.53 b	3.80 a	6.27 a	4.87 b	3.10 b
CD 208	28.24 b	18.92 b	0.00 b	2.65 a	69.82 a	39.31 b	0.00 c	0.00 b	3.80 a	2.93 b	3.40 c	3.63 b

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 9. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes cultivares, estirpes de *Bradyrhizobium*, submetidas a 24mM de nitrogênio.

Cultivar	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
RS 10	0.00 a	0.00 b	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 b	0.00 a	0.00 a	3.87 c	2.90 b	4.10 a	1.97 c
CD 208	0.00 a	0.64 b	0.00 a	0.64 a	0.00 a	0.94 b	0.00 a	1.53 a	5.87 a	4.90 a	3.00 b	6.33 a
BRS Torená	0.00 a	18.79 a	1.48 a	2.19 a	0.00 a	44.34 a	0.96 a	1.24 a	4.83 b	5.43 a	3.93 a	3.90 b
CD 208	0.00 a	0.00 b	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 b	0.00 a	0.00 a	3.40 c	3.17 b	2.70 b	3.97 b

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 10. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes doses de nitrogênio, estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizando a cultivar Fepagro RS-10.

Dose N (mM)	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
0	25.99 aB	51.94 aA	8.29 aC	21.31 aB	116.54 aA	115.14 aA	20.26 aB	83.58 aA	2.20 bAB	2.53 aAB	1.67 cB	2.73 aA
8	12.58 bA	13.95 cA	11.95 aA	0.94 bB	43.14 bA	38.10 bA	41.92 aA	1.09 bB	3.00 abB	2.73 aB	4.20 aA	2.63 aB
16	26.65 aA	33.51 bA	0.00 bB	0.00 bB	49.68 bA	57.20 bA	0.00 bB	0.00 bB	2.87 bAB	3.17 aA	2.90 bAB	2.17 aB
24	0.00 cA	0.00 dA	0.00 bA	0.00 bA	0.00 cA	0.00 cA	0.00 bA	0.00 bA	3.87 aA	2.90 aB	4.10 aA	1.97 aC

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna e maiúscula(s) na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 11. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes doses de nitrogênio, estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizando a cultivar CD 208.

Dose N (mM)	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
0	54.76 aA	55.78 aA	16.36 bB	11.27 abB	91.07 bA	96.70 bA	42.84 aB	23.74 abB	3.30 bB	3.07 bB	3.67 cB	5.50 bcA
8	45.05 aB	63.95 aA	25.44 abC	15.31 aC	155.04 aA	189.21 aA	42.31 aB	39.40 aB	5.33 aA	5.07 aA	4.60 bA	5.17 cA
16	49.76 aA	16.09 bC	27.45 aB	6.45 bD	54.86 bA	44.73 cA	73.41 aA	15.80 bB	3.53 bC	5.50 aB	7.43 aA	6.63 aA
24	0.00 bA	0.64 cA	0.00 cA	0.64 cA	0.00 cA	0.94 dA	0.00 bA	1.53 cA	5.87 aA	4.90 aB	3.00 cC	6.33 abA

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna e maiúscula(s) na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 12. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes doses de nitrogênio, estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizando a cultivar BRS Torena.

Dose N (mM)	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
0	71.96 aA	58.62 aAB	50.87 aBC	39.59 aC	126.43 aB	200.80 aA	119.07 aB	95.14 aB	3.60 bA	4.47 bA	3.83 bA	2.07 bB
8	72.23 aA	49.30 abB	39.91 abB	23.33 bC	153.07 aA	102.61 bBC	115.50 aAB	69.64 aC	5.37 aA	3.83 bB	4.27 abB	3.90 aB
16	0.64 bD	40.59 bA	26.66 bB	4.36 cC	1.95 bB	98.67 bA	11.70 bB	1.53 bB	3.80 bC	6.27 aA	4.87 aB	3.10 aC
24	0.00 bB	18.79 cA	1.48 cB	2.19 cB	0.00 bB	44.34 cA	0.96 cB	1.24 bB	4.83 aA	5.43 aA	3.93 bB	3.90 aB

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna e maiúscula(s) na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 13. Número de nódulos, massa de nódulos e massa da parte aérea da soja submetida a diferentes doses de nitrogênio, estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizando a cultivar CD 216.

Dose N (mM)	Estirpes											
	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080
	Número de Nódulos				Massa de Nódulos				Matéria Seca da Parte Aérea			
	n°				mg				g			
0	34.66 bC	52.62 aAB	40.41 aBC	59.49 aA	67.43 bB	156.63 aA	56.78 aB	153.43 aA	1.03 cA	1.43 bA	1.07 bA	1.70 bA
8	54.96 aA	42.21 aA	14.22 bB	15.86 bB	120.65 aAB	162.15 aA	55.95 aC	107.84 aB	4.33 aA	3.60 aAB	3.40 aBC	2.53 bC
16	28.24 bA	18.92 bA	0.00 cC	2.65 cB	69.82 bA	39.31 bA	0.00 bB	0.00 bB	3.80 abA	2.93 aA	3.40 aA	3.63 aA
24	0.00 cA	0.00 cA	0.00 cA	0.00 dA	0.00 cA	0.00 cA	0.00 bA	0.00 bA	3.40 bAB	3.17 aAB	2.70 aB	3.97 aA

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna e maiúscula(s) na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apêndice 14. Atributos químicos de um PVd (camada de 0-20cm) submetido a adubação mineral (com e sem irrigação) e orgânica, em dois sistemas de preparo do solo. Amostragem efetuada em outubro/2004.

Tratamentos	pH	Al _{troc.}	Ca _{troc.}	Mg _{troc.}	M.O.	P	K
		----- cmol _c L ⁻¹ -----			%	----- mg L ⁻¹ -----	
Adubação Mineral Irrigado							
PD - MIN IRR- GRÃO INV	6,3	0,0	5,2	2,4	2,7	7,0	188
PC - MIN IRR- GRÃO INV	6,0	0,0	4,4	2,1	2,7	8,2	195
PD - MIN IRR- COBERT. INV	6,2	0,0	5,5	2,4	3,2	11,5	216
PC - MIN IRR- COBERT. INV	5,7	0,0	3,6	1,8	2,7	4,7	222
Adubação Mineral							
PD - MIN - COBERT. INV	6,4	0,0	5,3	2,4	3,3	10	184
PC - MIN - COBERT. INV	5,8	0,0	3,6	1,9	2,6	5,8	209
PD - MIN - GRÃO INV	6,3	0,0	4,2	2,3	3,8	6,0	233
PC - MIN - GRÃO INV	5,8	0,0	3,4	1,7	2,6	4,3	206
Adubação Orgânica							
PD - MIN - GRÃO INV	6,0	0,0	5,8	1,8	3,6	42	245
PC - MIN - GRÃO INV	5,9	0,0	4,8	1,6	2,9	23	283
PD - ORG - GRÃO INV	6,3	0,0	5,8	1,7	3,6	39	257
PC - ORG - GRÃO INV	6,0	0,0	4,8	1,4	3,0	23	241

PD – plantio direto; PC – plantio convencional; MIN – adubação mineral; ORG – adubação orgânica (cama de aviário); IRR – utilização de irrigação; GRÃO INV – utilização de aveia ou trigo no inverno com colheita dos grãos; COBERT. INV – utilização de consórcio de aveia e ervilhaca no inverno